

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 833**

51 Int. Cl.:

C07K 14/31

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2017** **PCT/EP2017/061159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.11.2017** **WO17194593**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2017** **E 17727806 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.02.2022** **EP 3455241**

54 Título: **Método de limpieza y/o desinfección de una matriz de separación**

30 Prioridad:

11.05.2016 GB 201608229
11.05.2016 GB 201608232
30.09.2016 US 201615282367
10.11.2016 US 201615348699

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2022

73 Titular/es:

CYTIVA BIOPROCESS R&D AB (100.0%)
Björkgatan 30
751 84 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

FORSS, ANNIKA;
RODRIGO, GUSTAV, JOSÉ;
BJORKMAN, TOMAS;
ANDER, MATS y
HANSSON, JESPER, ULF

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 909 833 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de limpieza y/o desinfección de una matriz de separación

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para limpiar y/o desinfectar matrices de separación que comprenden multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente a un soporte poroso. La presente invención se refiere además a un método para prevenir el arrastre en la purificación de inmunoglobulinas con una matriz de separación que comprende multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente a un soporte poroso, así como al uso de un líquido de limpieza que comprende al menos al menos 70% en volumen de una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino para la desinfección de una matriz de separación.

Antecedentes de la técnica

Las inmunoglobulinas representan los productos biofarmacéuticos más habituales en las áreas de la fabricación o el desarrollo a nivel mundial. La alta demanda comercial y, por tanto, el valor de este mercado de productos terapéuticos concreto ha conducido a que las empresas farmacéuticas enfaticen la maximización de la productividad de sus respectivos procesos de fabricación de inmunoglobulinas, al mismo tiempo que controlan los costes asociados.

En la mayoría de los casos se usa la cromatografía de afinidad como una de las etapas clave en la purificación de estas moléculas de inmunoglobulina, tales como anticuerpos monoclonales (mAb) o anticuerpos policlonales (pAb). Una clase particularmente interesante de reactivos de actividad son las proteínas capaces de unirse específicamente a partes invariables de una molécula de inmunoglobulina, y dicha interacción es independiente de la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Estos reactivos pueden usarse ampliamente para la recuperación de inmunoglobulinas de diferentes muestras mediante cromatografía de afinidad, tales como, pero sin limitarse a preparaciones de suero o plasma o materias primas derivadas de cultivos celulares. Un ejemplo de dicha proteína es la proteína A estafilocócica, que contiene dominios capaces de unirse a las porciones Fc y Fab de inmunoglobulinas IgG procedentes de diferentes especies. Estos dominios se denominan habitualmente dominios E, D, A, B y C.

Los reactivos basados en la proteína A estafilocócica (SpA), debido a su alta afinidad y selectividad, se utilizan mucho en el campo de la biotecnología, por ejemplo, en la cromatografía de afinidad para la captura y la purificación de anticuerpos, así como para la detección o la cuantificación. En la actualidad, el medio de afinidad basado en SpA es, probablemente, el medio de afinidad más usado para el aislamiento de anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de diferentes muestras, incluyendo sobrenadantes de cultivos celulares industriales. Por consiguiente, en el mercado están disponibles diversas matrices que comprenden ligandos de proteína A, por ejemplo, en forma de la proteína A nativa (por ejemplo, Protein A SEPHAROSE™, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y también formados por proteína A recombinante (por ejemplo, rProtein A SEPHAROSE™, GE Healthcare). De modo más específico, la manipulación genética realizada en el producto de proteína A recombinante del mercado se dirige a facilitar su unión a un soporte y a aumentar la productividad del ligando.

Estas aplicaciones, al igual que otras aplicaciones de cromatografía de afinidad, requieren una atención exhaustiva a la eliminación definitiva de contaminantes. Estos contaminantes pueden ser, por ejemplo, molécula no eluidas adsorbidas sobre la fase estacionaria o matriz en un procedimiento cromatográfico, tales como biomoléculas o microorganismos no deseados que incluyen, por ejemplo, proteínas, carbohidratos, lípidos, endotoxinas, bacterias y virus. La eliminación de dichos contaminantes de la matriz se realiza habitualmente después de una primera elución del producto deseado para regenerar la matriz antes de un uso posterior. Limpiar la matriz de contaminantes habitualmente implica un procedimiento conocido como limpieza en el sitio ("cleaning-in-place", CIP), en el que se emplean agentes capaces de eluir contaminantes de la fase estacionaria. La inactivación de microorganismos implica normalmente un procedimiento conocido como desinfección en el sitio ("sanitization-in-place", SIP) en el que se utilizan agentes capaces de inactivar microorganismos. Algunos agentes son capaces tanto de limpiar como de desinfectar la matriz de separación, dependiendo de la concentración del agente y el tiempo de contacto con la matriz de separación. Una de estas clases de agentes que se emplean a menudo son las disoluciones alcalinas que se hacen pasar sobre dicha fase estacionaria. En la actualidad, el agente de limpieza y desinfección más empleado para la mayoría de matrices de separación es NaOH, y su concentración puede variar de 0,1 hasta, por ejemplo, 1 M, dependiendo del grado y la naturaleza de la contaminación. Sin embargo, esta estrategia está asociada con la exposición de la matriz a disoluciones con unos valores de pH mayores que 13. Para muchas matrices de cromatografía de afinidad que contienen ligandos de afinidad proteicos, este entorno alcalino es una condición muy rigurosa y, en consecuencia, provoca una disminución en las capacidades debido a la inestabilidad del ligando en el pH alto implicado.

Por tanto, ciertas investigaciones exhaustivas se han centrado en el desarrollo de ligandos de proteínas modificados que muestren una mayor capacidad para soportar valores de pH alcalino. Por ejemplo, Gülich et al. (Susanne Gülich, Martin Linhult, Per-Åke Nygren, Mathias Uhlén, Sophia Hober, Journal of Biotechnology, 80 (2000), 169-178) sugieren la modificación de proteínas para mejorar las propiedades de estabilidad de un dominio de unión a albúmina (ABD) estreptocócica en entornos alcalinos. Gülich et al. crearon un mutante de ABD, en el que los cuatro restos asparagina se reemplazan por leucina (un residuo), aspartato (dos residuos) y lisina (un residuo). Además, Gülich et al. indicaron

que su mutante muestra un comportamiento de unión a la proteína diana similar al de la proteína nativa, y que las columnas de afinidad que contienen el ligando modificado muestran mayores capacidades de unión después de una exposición repetida a condiciones alcalinas que otras columnas preparadas usando el ligando no modificado originario. Por tanto, en ese documento se concluye que los cuatro restos asparagina pueden reemplazarse sin que se produzca ningún efecto significativo sobre la estructura y la función.

Un trabajo reciente demuestra que también pueden realizarse cambios en la proteína A (SpA) para conseguir propiedades similares. La publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2005/0143566 indica que, cuando al menos un resto asparagina se muta en un aminoácido distinto de glutamina o ácido aspártico, la mutación confiere una mayor estabilidad química a valores de pH de hasta aproximadamente 13-14, en comparación con la SpA originaria, tal como el dominio de B de SpA, o proteína Z, una construcción sintética derivada del dominio B de SpA (documento US 5.143.844). Los autores demuestran que cuando se emplean estas proteínas mutadas como ligandos de afinidad, el medio de separación puede soportar mejor los procedimientos de limpieza que usan agentes alcalinos, tal como se esperaba. También se han publicado otras mutaciones de dominios de la proteína A con el fin de aumentar la estabilidad alcalina en los documentos US 8.329.860, JP 2006304633A, US 8.674.073, US 2010/0221844, US 2012/0208234, US 9.051.375, US 2014/0031522, US 2013/0274451 y WO 2014/146350. Sin embargo, los mutantes disponibles en la actualidad siguen siendo sensibles a un pH alcalino, y la concentración de NaOH durante la limpieza habitualmente se limita a 0,1 M, lo cual significa que una limpieza completa es difícil de lograr. Además, una concentración de NaOH de este tipo es insuficiente en sí misma para la desinfección eficaz de la matriz de separación por afinidad y, por lo tanto, la desinfección a menudo se realiza usando disoluciones que comprenden alcoholes tales como etanol o isopropanol. Unas concentraciones más altas de NaOH, que podrían mejorar la limpieza y la desinfección, conducen a pérdidas de capacidad inaceptables de la matriz de separación por afinidad.

Por tanto, en este campo sigue siendo necesaria una matriz de separación que contenga ligandos de proteínas que tengan mayor estabilidad frente a procedimientos de limpieza y desinfección alcalinos. También son necesarias dichas matrices con una mayor capacidad de unión para permitir una purificación económicamente eficaz de anticuerpos terapéuticos.

Sumario de la invención

Los inventores de la presente invención han reconocido que las disoluciones alcohólicas son subóptimas para la desinfección de matrices de separación por afinidad. Los alcoholes son inflamables, están sujetos a regulación y son difíciles de desechar. Además, los inventores de la presente invención han reconocido que una concentración baja de NaOH, tal como NaOH 0,1 M, proporciona una limpieza insuficiente para permitir que la matriz de separación se use para la purificación de una diversidad de productos de inmunoglobulina diferentes. En cambio, la matriz de separación generalmente solo se usa para purificar lotes separados de un solo producto para evitar el arrastre de impurezas de un producto a otro. Los inventores han reconocido que las disoluciones acuosas concentradas de hidróxido de metal alcalino tienen una serie de ventajas como disoluciones de limpieza y conservación. Las disoluciones concentradas de hidróxido de metal alcalino son bacteriostáticas y pueden inactivar la mayoría de los virus, bacterias, levaduras, hongos y endotoxinas. Son capaces de eliminar eficazmente las impurezas de la matriz de separación hasta tal punto que la misma matriz de separación puede usarse para purificar una diversidad de inmunoglobulinas. Esto facilita el uso de la matriz de separación como plataforma de separación. Además, las disoluciones concentradas de hidróxido de metal alcalino son relativamente baratas, se eliminan fácilmente y la eliminación de la matriz de separación es simple de detectar usando mediciones de pH y/o conductividad.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para limpiar y desinfectar una matriz de separación por afinidad para la purificación de inmunoglobulinas que permita el uso de una disolución concentrada de hidróxido de metal alcalino.

Este objeto se consigue mediante el método según las reivindicaciones adjuntas de limpieza y/o desinfección de una matriz de separación que comprende múltiplos de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente a un soporte poroso. Los dominios de proteína A estabilizados con álcali comprenden mutantes de un dominio de unión a Fc parental de la proteína A (SpA) de *Staphylococcus*, como se define en SEQ ID NO 51 o SEQ ID NO 52, en los que los restos aminoácidos en las posiciones 13 y 44 de SEQ ID NO 51 o 52 son asparaginas, y en los que al menos el resto asparagina en la posición 3 de SEQ ID NO 51 o 52 se ha mutado a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina, valina, alanina, histidina y arginina. El método comprende las etapas de:

- a) purificar una mezcla que comprende una primera inmunoglobulina utilizando la matriz de separación;
- b) proporcionar un líquido de limpieza que comprende al menos un 50% en volumen de una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino; y
- c) limpiar y/o desinfectar la matriz de separación poniendo en contacto el líquido de limpieza con la matriz de separación durante un tiempo de contacto predeterminado.

El objeto de la invención se logra además mediante un método para evitar el arrastre en la purificación de inmunoglobulinas con una matriz de separación que comprende múltiplos de dominios de proteína A estabilizados

con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente a un soporte poroso, como se define en las reivindicaciones adjuntas. El método comprende además la etapa de:

d) purificar una mezcla que comprende una segunda inmunoglobulina usando la matriz de separación, en la que la segunda inmunoglobulina es diferente de la primera inmunoglobulina.

5 Mediante el uso de una matriz de separación que comprende multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina como se definió anteriormente, se obtiene una matriz de separación altamente estable a los álcalis que tiene una alta capacidad de unión dinámica. Los inventores de la presente invención han observado que dichas matrices de separación son relativamente estables tras la impregnación con una disolución acuosa concentrada de hidróxido de metal alcalino y retienen sustancialmente la capacidad de unión dinámica
10 después del contacto con dicha disolución concentrada de hidróxido de metal alcalino. Esto significa que dichas matrices de separación son adecuadas para la limpieza y/o desinfección con disoluciones concentradas de hidróxido de metal alcalino.

Otras mutaciones en los dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a la inmunoglobulina pueden proporcionar una mejora adicional de las propiedades, tales como una estabilidad alcalina mejorada. Por ejemplo, el
15 resto glutamina en la posición 1 de SEQ ID NO 51 o 52 puede mutarse a una alanina; y/o el resto asparagina o ácido glutámico en la posición 35 de SEQ ID NO 51 o 52 puede mutarse a una alanina.

Los multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina pueden ser homomultímeros seleccionados del grupo que consiste en dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros o nonámeros. Mediante el uso de un multímero apropiado, se puede aumentar la capacidad
20 de unión a inmunoglobulina y la estabilidad alcalina de la matriz de separación.

Los multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina pueden comprender cada uno un resto cisteína C-terminal para el acoplamiento covalente al soporte poroso. Los multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina pueden acoplarse al soporte poroso a través de enlaces tioéter. Esto proporciona un método robusto, estable frente a los álcalis y bien probado para unir los ligandos
25 al soporte sólido.

La matriz de separación puede comprender al menos 11 mg/ml, tal como al menos 15 mg/ml, de los multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente al soporte poroso. Esto asegura una matriz de separación con una buena capacidad de unión.

El soporte poroso puede comprender partículas de polímero reticulado que tienen un diámetro medio ponderado por volumen ($d_{50,v}$) de 56-70 micrómetros y un peso de sólidos secos de 55-80 mg/ml. El soporte poroso puede ser, por
30 ejemplo, esferas de agarosa altamente reticuladas.

La disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino utilizada en el líquido de limpieza puede ser una disolución de hidróxido de sodio, una disolución de hidróxido de potasio o una mezcla de las mismas, preferiblemente una disolución de hidróxido de sodio. La disolución de hidróxido de sodio es relativamente barata, fácilmente disponible y
35 ampliamente aceptada para su uso como disolución de limpieza y desinfección. La disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino puede tener una molaridad de 500 mM a 5 M, tal como de 1 M a 2 M. Esto asegura una disolución con buenas propiedades bactericidas.

En algunos casos, el líquido de limpieza puede comprender además un alcohol C2-C7, como etanol, isopropanol o alcohol bencílico. Un líquido de limpieza que combine un alcohol y un hidróxido de metal alcalino puede ser más eficaz
40 para inactivar ciertos microorganismos, como algunas bacterias formadoras de esporas.

El líquido de limpieza puede comprender al menos un 70% en volumen de disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino, como al menos un 90% en volumen de disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino, preferiblemente al menos un 99% en volumen de disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino.

En algunos casos, el líquido de limpieza puede consistir o consistir esencialmente en una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino.
45

El tiempo de contacto predeterminado puede ser un tiempo suficiente para proporcionar una reducción de 6-log₁₀ en la concentración de endotoxinas y/o la concentración de microorganismos en la matriz de separación. El tiempo de contacto predeterminado puede ser de 10 minutos a 50 horas, como de 30 minutos a 24 horas, o de 1 hora a 12 horas. Dichos tiempos de contacto suelen ser suficientes para inactivar una amplia gama de microorganismos.

Las etapas a)-c) del método anterior pueden repetirse al menos 10 veces, como al menos 50 veces o 50-200 veces. Por lo tanto, la matriz de separación se puede reutilizar muchas veces conservando aún la capacidad suficiente para lograr una purificación aceptable.
50

Otros objetos, ventajas y características novedosas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada.

Definiciones

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en la presente e incluyen también fragmentos de anticuerpo, proteínas de fusión que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y conjugados que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

- 5 Las expresiones "polipéptido de unión a Fc", "dominio de unión a Fc" y "proteína de unión a Fc" significan un polipéptido, un dominio o una proteína, respectivamente, capaz de unirse a la parte cristalizable (Fc) de un anticuerpo e incluyen, por ejemplo, proteína A y proteína G, o cualquiera de sus fragmentos o proteínas de fusión que mantengan dicha propiedad de unión.

- 10 El término "conector" en la presente significa un elemento que conecta dos unidades de polipéptido, monómeros o dominios entre sí para formar un multímero.

El término "espaciador" en la presente significa un elemento que conecta un polipéptido o un multímero de polipéptido a un soporte.

- 15 La expresión "% de identidad" con respecto a las comparaciones de secuencias de aminoácidos se determina mediante algoritmos de alineamiento convencionales, tales como, por ejemplo, Basic Local Alignment Tool (BLAST™) descrito en Altshul *et al.* (1990), J. Mol. Biol., 215:403-410. Está libremente disponible un software con base en la red de US National Library of Medicine en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. En este caso, se usa el algoritmo "blastp (protein-protein BLAST)" para el alineamiento de una secuencia interrogante con una secuencia sujeto y determinar, concretamente, el porcentaje de identidad.

- 20 Tal como se emplean en la presente, los términos "comprende", "comprendiendo", "contiene", "teniendo" y similares tienen el significado atribuido a ellos en la ley de patentes de EE. UU. y pueden significar "incluye", "incluyendo" y similares; de modo similar, las expresiones "consiste fundamentalmente en" o "consiste fundamentalmente" tienen el significado atribuido a ellas en la ley de patentes de EE. UU. y las expresiones no tienen un límite fijo, permitiendo la presencia de más de lo que se indica, con la condición de que las características básicas o nuevas de lo que se indica no cambien por la presencia de más de lo que se indica, pero excluyen las realizaciones de la técnica anterior.

25 Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención y objetos y ventajas adicionales de la misma, se debe leer la descripción detallada que se presenta a continuación junto con las figuras adjuntas, y en las cuales:

- La figura 1 muestra un alineamiento de los dominios de unión a Fc, según se definen mediante SEQ ID NO:1-7 y 51-52.
- 30 La figura 2 muestra los resultados del ejemplo 2 para la estabilidad alcalina de variantes del polipéptido Zvar tetramérico originario y mutado (SEQ ID NO 7) acoplados a un chip biodetector SPR.
- La figura 3 muestra los resultados del ejemplo 4 para la estabilidad alcalina (NaOH 0,5 M) de variantes del polipéptido Zvar tetramérico originario y mutado (SEQ ID NO 7) acoplados a esferas de agarosa.
- 35 La figura 4 muestra los resultados del ejemplo 4 para la estabilidad alcalina (NaOH 1,0 M) de variantes del polipéptido Zvar tetramérico originario y mutado (SEQ ID NO 7) acoplados a esferas de agarosa.
- La figura 5 muestra los resultados del ejemplo 7 para la estabilidad alcalina (NaOH 1,0 M) de esferas de agarosa con diferentes cantidades de variantes de multímeros mutados (SEQ ID NO. 20) acoplados. Los resultados se representan gráficamente como la capacidad dinámica remanente relativa (Qb10%, 6 min de tiempo de residencia) frente al tiempo de incubación en NaOH 1 M.
- 40 La figura 6 muestra los resultados del ejemplo 7 para la estabilidad alcalina (NaOH 1,0 M) de esferas de agarosa con diferentes cantidades de variantes de multímeros mutados (SEQ ID NO. 20) acoplados. Los resultados se representan gráficamente como la capacidad dinámica remanente relativa (Qb10%, 6 min de tiempo de residencia) después de 31 h de incubación en NaOH 1 M frente al contenido en ligando de los prototipos.
- 45 La figura 7 muestra los resultados de una elución en gradiente de pH de IgG humana policlonal a) de la matriz de referencia MabSelect SuRe LX y b) una matriz según la invención.
- La figura 8 muestra unos análisis de los componentes de IgG1, IgG2 e IgG4 en fracciones de los cromatogramas de la figura 7. a) matriz de referencia y b) matriz según la invención. Para cada fracción, la primera barra (azul) representa IgG1, la segunda (roja) IgG4 y la tercera (verde) IgG2.

- La figura 9 muestra los resultados de mediciones aceleradas de estabilidad alcalina con incubación con NaOH 1 M para la matriz de referencia MabSelect SuRe LX (MSS LX) y una matriz según la invención. La estabilidad se expresa como el porcentaje del 10% de capacidad de remoción restante después de la incubación.
- 5 La figura 10 muestra los resultados de ciclos CIP repetidos utilizando NaOH 2 M como líquido de limpieza para la matriz de referencia MabSelect SuRe (MSS) y una matriz de separación según la invención (Inv. Ex). La capacidad de cada matriz de separación en relación con la capacidad inicial (determinada como volumen de carga al 35% de la DBC de remoción) se muestra como una función del número de ciclos.
- 10 La figura 11 muestra los resultados de la incubación con NaOH 1 M, la matriz de referencia MabSelect SuRe LX (MSS LX) y una matriz de separación según la invención (Inv. Ex). Se muestra la fluorescencia relativa en función del tiempo debido a la unión de hlgG marcada para cada una de las matrices de separación incubadas durante períodos establecidos de 0, 16 y 32 horas.
- 15 La figura 12 muestra los resultados de la incubación con NaOH 1 M, la matriz de referencia MabSelect SuRe LX (MSS LX) y una matriz de separación según la invención (Inv. Ex). La fluorescencia relativa en función del tiempo debido a la unión de hlgG marcada se muestra para cada una de las matrices de separación incubadas durante períodos establecidos de hasta 32 horas.
- La figura 13 muestra los resultados de la inactivación de esporas de *B. subtilis* usando fluidos de limpieza que comprenden NaOH 1 M.
- 20 **Descripción detallada**
- Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para limpiar y/o desinfectar una matriz de separación que comprende múltiplos de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente a un soporte poroso.
- 25 A lo largo de esta descripción detallada, se pueden usar dos convenciones de numeración separadas. A menos que se indique lo contrario, se usa la convención de numeración de posiciones de restos aminoácidos de la figura 1, y los números de posición se designan como correspondientes a los de SEQ ID NO 4-7. Esto se aplica también a los múltiplos, en los que los números de posición designan las posiciones en los monómeros o unidades polipeptídicas según la convención de la figura 1, a menos que se indique lo contrario. Sin embargo, a lo largo de las reivindicaciones, el sumario de la invención y, en ocasiones, en la descripción detallada, se utilizan los números de posición correspondientes a los de SEQ ID NO 51 y 52. Obsérvese que la posición 1 de SEQ ID NO 51 o SEQ ID NO 52 corresponde a la posición 9 de SEQ ID NO 4-7, y de esta manera pueden interconvertirse las diferentes convenciones de numeración.
- 30 Los dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina de la invención, también denominados en el presente documento "el polipéptido", comprenden, consisten esencialmente o consisten en
- 35 mutantes de un dominio de unión a Fc parental de proteína A de *Staphylococcus* (SpA), como se define por SEQ ID NO 51 o SEQ ID NO 52, en las que los restos aminoácidos en las posiciones 13 y 44 de SEQ ID NO 51 o 52 son asparaginas, y en las que al menos el resto asparagina en la posición 3 de SEQ ID NO 51 o 52 ha sido mutado a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina, valina, alanina, histidina y arginina.
- 40 SEQ ID NO 51 (Zvar truncado)
- QQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAP IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQ
- SEQ ID NO 52 (dominio C truncado)
- QQ NAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK LNDAQ
- 45 Dichos dominios de proteína A estabilizados con álcali de unión a inmunoglobulina de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en mutantes de un dominio de unión a Fc parental de la proteína A (SpA) de *Staphylococcus*, como se define por las siguientes secuencias, o tienen al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% identidad con SEQ ID NO: 1 (dominio E), SEQ ID NO: 2 (dominio D), SEQ ID NO: 3 (dominio A), SEQ ID NO: 22 (variante de dominio A), SEQ ID NO: 4 (dominio B), SEQ ID NO: 5 (dominio C), SEQ ID NO: 6 (proteína Z), SEQ ID NO: 7 (Zvar), y de acuerdo con la presente invención, los dominios de proteína A
- 50 estabilizados con álcali comprenden mutantes de un dominio de unión a Fc parental de la proteína A (SpA) de *Staphylococcus*, como se define en la SEQ ID NO 51 (Zvar sin los aminoácidos 1-8 y 56-58 de la región conectora) o la SEQ ID NO 52 (dominio C sin los aminoácidos 1-8 y 56-58 de la región conectora) como se ilustra en la figura 1, en los que al menos el resto asparagina (o serina, en el caso de SEQ ID NO 2) en la posición correspondiente a la posición 11 en SEQ ID NO 4-7 ha sido mutado a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina, valina, alanina, histidina y arginina, y en los
- 55

que los restos asparagina correspondientes a las posiciones 21 y 52 en SEQ ID NO:4-7 (posiciones 13 y 44 de SEQ ID NO 51 o 52) se conservan.

Varios de los dominios de unión a Fc enumerados anteriormente se muestran alineados en la figura 1. La proteína A (SpA) de *Staphylococcus* parental, es decir, no manipulada, comprende cinco dominios comedores de Fc denominados dominio E (SEQ ID NO 1), D (SEQ ID NO 2), A (SEQ ID NO 3), B (SEQ ID NO 4) y C (SEQ ID NO 5). La proteína Z (SEQ ID NO:6) es un dominio B mutado como se describe en el documento US5143844. SEQ ID NO 7 indica otra variante mutada de proteína Z, denominada en el presente documento Zvar, con las mutaciones N3A, N6D, N23T. SEQ ID NO:22 (no se muestra en la figura 1) es una variante natural del dominio A en la proteína A de la cepa N315 de *Staphylococcus aureus*, que tiene una mutación A46S, usando la terminología de posición de la figura 1. SEQ ID NO 51 es Zvar (SEQ ID NO 7) sin los aminoácidos de la región conectora en las posiciones 1-8 y 56-58. SEQ ID NO 52 es el dominio C de la proteína A sin los aminoácidos 1-8 y 56-58 de la región conectora como se ilustra en la figura 1.

La mutación de N11 (N3 de SEQ ID NO 51:52) en estos dominios, junto con la conservación de los restos asparagina N21 y N52 (N13 y N44 de SEQ ID NO 51:52) confiere una estabilidad alcalina mejorada en comparación con el polipéptido/dominio parental, sin afectar a las propiedades de unión a inmunoglobulina. Por lo tanto, el polipéptido también se puede describir como un polipéptido de unión a Fc o a inmunoglobulina o, como alternativa, como una unidad polipeptídica de unión a Fc o a inmunoglobulina.

Descritos en un lenguaje alternativo, los dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en una secuencia definida por la siguiente secuencia, o tener al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad con SEQ ID NO 53.

SEQ ID NO 53

X₁Q X₂AFYEILX₃LP NLTEEQRX₄X₅F IX₆X₇LKDX₈PSX₉ SX₁₀X₁₁X₁₂LAEAKX₁₃ X₁₄NX₁₅AQ

en la que individualmente entre sí:

X₁ = A, Q o está deletado

X₂ = E, K, Y, T, F, L, W, I, M, V, A, H o R

X₃ = H o K

X₄ = A o N

X₅ = A, G, S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K, como S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K

X₆ = Q o E

X₇ = S o K

X₈ = E o D

X₉ = Q, V o está deletado

X₁₀ = K, R, A o está deletado

X₁₁ = A, E, N o está deletado

X₁₂ = I o L

X₁₃ = K o R

X₁₄ = L o Y

X₁₅ = D, F, Y, W, K o R

Específicamente, los restos aminoácidos en SEQ ID NO 53 pueden ser individualmente entre sí:

X₁ = A o está deletado

X₂ = E

X₃ = H

X₄ = N

X₆ = Q

$X_7 = S$

$X_8 = D$

$X_9 = V$ o está deleciónado

$X_{10} = K$ o está deleciónado

5 $X_{11} = A$ o está deleciónado

$X_{12} = I$

$X_{13} = K$

$X_{14} = L$

10 En ciertas realizaciones, los restos aminoácidos en SEQ ID NO 53 pueden ser: $X_1 = A$, $X_2 = E$, $X_3 = H$, $X_4 = N$, $X_6 = Q$, $X_7 = S$, $X_8 = D$, $X_9 = V$, $X_{10} = K$, $X_{11} = A$, $X_{12} = I$, $X_{13} = K$, $X_{14} = L$. En algunas realizaciones $X_2 = E$, $X_3 = H$, $X_4 = N$, $X_5 = A$, $X_6 = Q$, $X_7 = S$, $X_8 = D$, $X_{12} = I$, $X_{13} = K$, $X_{14} = L$ y $X_{15} = D$ y uno o más de X_1 , X_9 , X_{10} y X_{11} esta deleciónado. En realizaciones adicionales, $X_1 = A$, $X_2 = E$, $X_3 = H$, $X_4 = N$, $X_5 = S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R$ o K , $X_6 = Q$, $X_7 = S$, $X_8 = D$, $X_9 = V$, $X_{10} = K$, $X_{11} = A$, $X_{12} = I$, $X_{13} = K$, $X_{14} = L$ y $X_{15} = D$ o, como alternativa, $X_1 = A$, $X_2 = E$, $X_3 = H$, $X_4 = N$, $X_5 = A$, $X_6 = Q$, $X_7 = S$, $X_8 = D$, $X_9 = V$, $X_{10} = K$, $X_{11} = A$, $X_{12} = I$, $X_{13} = K$, $X_{14} = L$ y $X_{15} = F, Y, W, K$ o R .

15 En algunas realizaciones, los restos aminoácidos pueden ser individualmente entre sí:

a) $X_1 = A$ o está deleciónado, $X_2 = E$, $X_3 = H$, $X_4 = N$, $X_6 = Q$, $X_7 = S$, $X_8 = D$, $X_9 = V$ o está deleciónado, $X_{10} = K$ o está deleciónado, $X_{11} = A$ o está deleciónado, $X_{12} = I$, $X_{13} = K$, $X_{14} = L$;

b) $X_1 = A$, $X_2 = E$, $X_3 = H$, $X_4 = N$, $X_5 = A$, $X_6 = Q$, $X_7 = S$, $X_8 = D$, $X_9 = V$, $X_{10} = K$, $X_{11} = A$, $X_{12} = I$, $X_{13} = K$, $X_{14} = L$ y $X_{15} = D$;

20 c) X_1 es A , $X_2 = E$, $X_3 = H$, $X_4 = N$, $X_6 = Q$, $X_7 = S$, $X_8 = D$, $X_9 = V$, $X_{10} = K$, $X_{11} = A$, $X_{12} = I$, $X_{13} = K$, $X_{14} = L$ y $X_{15} = D$; o

d) X_1 es A , $X_3 = H$, $X_4 = N$, $X_5 = A$, $X_6 = Q$, $X_7 = S$, $X_8 = D$, $X_9 = V$, $X_{10} = K$, $X_{11} = A$, $X_{12} = I$, $X_{13} = K$, $X_{14} = L$ y $X_{15} = D$.

25 La mutación N11 (X_2) (por ejemplo, una mutación N11E o N11K) puede ser la única mutación o el polipéptido también puede comprender otras mutaciones, tales como sustituciones en al menos una de las posiciones correspondientes a las posiciones 3, 6, 9, 10, 15, 18, 23, 28, 29, 32, 33, 36, 37, 40, 42, 43, 44, 47, 50, 51, 55 y 57 en SEQ ID NO:4-7. En una o más de estas posiciones, el resto aminoácido original, por ejemplo, puede estar sustituido por un aminoácido que no es asparagina, prolina o cisteína. El resto aminoácido original, por ejemplo, puede estar sustituido por una alanina, una valina, una treonina, una serina, una lisina, un ácido glutámico o un ácido aspártico. Además, uno o más restos aminoácidos pueden estar deleciónados, por ejemplo, de las posiciones 1-6 y/o de las posiciones 56-58.

30 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 9 en SEQ ID NO:4-7 (X_1) es un aminoácido distinto de glutamina, asparagina, prolina o cisteína, tal como una alanina, o puede estar deleciónado. La combinación de las mutaciones en las posiciones 9 y 11 proporciona una estabilidad alcalina particularmente buena, tal como se muestra en los ejemplos. En realizaciones específicas, en SEQ ID NO:7, el resto aminoácido en la posición 9 es una alanina, y el resto aminoácido en la posición 11 es una lisina o un ácido glutámico, tal como una lisina. Las mutaciones en la posición 9 también se analizan en la solicitud en tramitación junto con la presente PCT/SE2014/050872.

En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 50 en SEQ ID NO:4-7 (X_{13}) es una arginina o un ácido glutámico.

40 En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 3 en SEQ ID NO:4-7 es una alanina y/o el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 6 en SEQ ID NO:4-7 es un ácido aspártico. Uno de los restos aminoácidos en las posiciones 3 y 6 puede ser una asparagina y, en una realización alternativa, ambos restos aminoácidos en las posiciones 3 y 6 pueden ser asparaginas.

45 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 43 en SEQ ID NO:4-7 (X_{11}) es una alanina o un ácido glutámico, tal como una alanina, o puede estar deleciónado. En realizaciones específicas, los restos aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO:7 son alanina y lisina/ácido glutámico, respectivamente, mientras que el resto aminoácido en la posición 43 es alanina o ácido glutámico.

En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 28 en SEQ ID NO:4-7 (X_5) es una alanina o una asparagina, tal como una alanina.

50 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 40 en SEQ ID NO:4-7 (X_9) se selecciona del grupo que consiste en asparagina, alanina, ácido glutámico y valina, o del grupo que consiste en ácido

glutámico y valina, o puede estar delecionado. En realizaciones específicas, los restos aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO:7 son alanina y ácido glutámico, respectivamente, mientras que el resto aminoácido en la posición 40 es valina. Opcionalmente, entonces el resto aminoácido en la posición 43 puede ser alanina o ácido glutámico.

5 En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 42 en SEQ ID NO:4-7 (X₁₀) es una alanina, una lisina o una arginina, o puede estar delecionado.

En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 18 en SEQ ID NO:4-7 (X₃) es una lisina o una histidina, tal como una lisina.

En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 33 en SEQ ID NO:4-7 (X₇) es una lisina o una serina, tal como una lisina.

10 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 37 en SEQ ID NO:4-7 (X₈) es un ácido glutámico o un ácido aspártico, tal como un ácido glutámico.

En ciertas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 51 en SEQ ID NO:4-7 (X₁₄) es una tirosina o una leucina, tal como una tirosina.

15 En algunas realizaciones, el resto aminoácido en la posición correspondiente a la posición 44 en SEQ ID NO:4-7 (X₁₂) es una leucina o una isoleucina. En realizaciones específicas, los restos aminoácidos en las posiciones 9 y 11 en SEQ ID NO:7 son alanina y lisina/ácido glutámico, respectivamente, mientras que el resto aminoácido en la posición 44 es isoleucina. Opcionalmente, entonces el resto aminoácido en la posición 43 puede ser alanina o ácido glutámico.

20 En algunas realizaciones, los restos aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 1, 2, 3 y 4, o a las posiciones 3, 4, 5 y 6 en SEQ ID NO:4-7 han sido delecionados. En variantes específicos de estas realizaciones, el polipéptido originario es el dominio C de la proteína A (SEQ ID NO:5). Los efectos de estas delecciones sobre el dominio C nativo se describen en los documentos US9018305 y US8329860.

25 En ciertas realizaciones, la mutación en SEQ ID NO 4-7, tal como en SEQ ID NO 7, se selecciona del grupo que consiste en: N11K; N11E; N11Y; N11T; N11F; N11L; N11W; N11I; N11M; N11V; N11A; N11H; N11R; N11E,Q32A; N11E,Q32E,Q40E; N11E,Q32E,K50R; Q9A,N11E,N43A; Q9A,N11E,N28A,N43A; Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I; Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I; N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y; Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I; Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y; N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I; Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I; Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R; Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R; Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I y Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I. Estas mutaciones proporcionan estabilidades alcalinas particularmente altas. La mutación en SEQ ID NO 4-7, tal como en SEQ ID NO 7, también puede seleccionarse del grupo que consiste en N11K; N11Y; N11F; N11L; N11W; N11I; N11M; N11V; N11A; N11H; N11R; Q9A,N11E,N43A; Q9A,N11E,N28A,N43A; Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I; Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I; N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y; Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y; N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I; Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I y Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido comprende o consiste fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 28, SEQ ID NO 29, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 39, SEQ ID NO 40, SEQ ID NO 41, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49 y SEQ ID NO 50. Por ejemplo, puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 28 y SEQ ID NO 29. También puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 25, SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 28, SEQ ID NO 38, SEQ ID NO 40; SEQ ID NO 41; SEQ ID NO 42; SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 47 y SEQ ID NO 48.

55 En ciertas realizaciones, el polipéptido comprende o consiste fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 54-70, comprende o consiste fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 71-75, o puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 76-79. También puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia definida por, o que tiene al

menos 90%, 95% o 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 89-95.

Por ejemplo, el polipéptido puede definirse mediante una secuencia seleccionada de los anteriores grupos o de subconjuntos de estos grupos, pero también puede comprender restos aminoácidos adicionales en el extremo N- y/o C-terminal, por ejemplo, una secuencia conductora en el extremo N-terminal y/o una secuencia de cola en el extremo C-terminal.

SEQ ID NO 8 Zvar(Q9A,N11E,N43A)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 9 Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 10 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 11 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 12 Zvar(N11E,Q32A)
VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IASLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 13 Zvar(N11E)
VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 14 Zvar(N11E,Q32E,Q40E)
VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IESLKDDPSE SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 15 Zvar(N11E,Q32E,K50R)
VDAKFDKEQQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IESLKDDPSQ SANLLAEAKR
LNDQAQPK

SEQ ID NO 16 Zvar(N11K)
VDAKFDKEQQ KAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 23 Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)
VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDAQAPK

SEQ ID NO 24 Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 25 Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)
VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRAILAEAKR
YNDAQAPK

SEQ ID NO 26 Zvar(N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)
VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRAILAEAKK
LNDQAQPK

SEQ ID NO 27 Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)
VDAKFDKEAQ **K**AFYEIL**K**LPL NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ **S**RAILAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 28 Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R)
VDAKFDKEAQ **K**AFYEIL**K**LPL NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ **S**RAILAEAK**R**
LNDAQAPK

SEQ ID NO 29 Zvar(Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R)
VDAKFDKEAQ **K**AFYEIL**K**LPL NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ **S**RNLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 36 B(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)
ADNKFNKEAQ **E**AFYEILHLP NLNEEQRNGF IQSLKDDPSV **S**KAILAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 37 C(Q9A,N11E,E43A)
ADNKFNKEAQ **E**AFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV **S**KAILAEAKK
LNDAQAPK

5

SEQ ID NO 38 Zvar(N11Y)
VDAKFDKEQQ **Y**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 39 Zvar(N11T)
VDAKFDKEQQ **T**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 40 Zvar(N11F)
VDAKFDKEQQ **F**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 41 Zvar(N11L)
VDAKFDKEQQ **L**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

10

SEQ ID NO 42 Zvar(N11W)
VDAKFDKEQQ **W**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 43 Zvar(N11I)
VDAKFDKEQQ **I**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 44 Zvar(N11M)
VDAKFDKEQQ **M**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 45 Zvar(N11V)
VDAKFDKEQQ **V**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 46 Zvar(N11A)
VDAKFDKEQQ **A**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

15

SEQ ID NO 47 Zvar(N11H)
VDAKFDKEQQ **H**AFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ **S**ANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 48 Zvar(N11R)
VDAKFDKEAQ **RAF**YEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 49 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 50 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV **SRAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 54 Zvar(Q9A,N11E, A29G,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

5 SEQ ID NO 55 Zvar(Q9A,N11E, A29S,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNSF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 56 Zvar(Q9A,N11E, A29Y,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNYF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 57 Zvar(Q9A,N11E, A29Q,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNQF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 58 Zvar(Q9A,N11E, A29T,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNTF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

10 SEQ ID NO 59 Zvar(Q9A,N11E, A29N,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNMF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 60 Zvar(Q9A,N11E, A29F,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNFF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 61 Zvar(Q9A,N11E, A29L,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNLF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 62 Zvar(Q9A,N11E, A29W,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNWF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 63 Zvar(Q9A,N11E, A29I,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNIF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

15 SEQ ID NO 64 Zvar(Q9A,N11E, A29M,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNMF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 65 Zvar(Q9A,N11E, A29V,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ **EAF**YEILHLP NLTEEQRNVF IQSLKDDPSV **SKAIL**AEAKK
LND AQAPK

SEQ ID NO 66 Zvar(Q9A,N11E, A29D,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNDF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQAPK

SEQ ID NO 67 Zvar(Q9A,N11E, A29E,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNEF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQAPK

SEQ ID NO 68 Zvar(Q9A,N11E, A29H,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNHF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQAPK

SEQ ID NO 69 Zvar(Q9A,N11E, A29R,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNRF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQAPK

5 SEQ ID NO 70 Zvar(Q9A,N11E, A29K,Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNKF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQAPK

SEQ ID NO 71 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53F)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNFAQAPK

SEQ ID NO 72 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53Y)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNYAQAPK

SEQ ID NO 73 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53W)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNWAQAPK

SEQ ID NO 74 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53K)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNKAQAPK

10 SEQ ID NO 75 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I,D53R)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNRAQAPK

SEQ ID NO 76 Zvar(Q9del,N11E, Q40V,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKE_Q EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQAPK

SEQ ID NO 77 Zvar(Q9A,N11E, Q40del,A42K,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPS_ SKAILAEAKK
LNDQAQAPK

SEQ ID NO 78 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42del,N43A,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV S_AILAEAKK
LNDQAQAPK

SEQ ID NO 79 Zvar(Q9A,N11E, Q40V,A42K,N43del,L44I)
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SK_ILAEAKK
LNDQAQAPK

15 SEQ ID NO 89 Zvar(D2del,A3del,K4del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)
V__FDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQAPK

SEQ ID NO 90 Zvar(V1del,D2del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,K58del)
 __AKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAAP_

SEQ ID NO 91 Zvar(K4del,F5del,D6del,K7del,E8del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)
 VDA___AQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAAPK

SEQ ID NO 92 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,A56del,P57del,K58del)
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQA___

SEQ ID NO 93 Zvar(V1del,,D2del,A3del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)
 __KFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAAPK

SEQ ID NO 94

Zvar(V1del,D2del,A3del,K4del,F5del,D6del,K7del,E8del,Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)
 _____AQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAAPK

SEQ ID NO 95 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I,K58_insYEDG)
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAAPKYE DG

La matriz de separación comprende multímeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis de unión a inmunoglobulina. Tales multímeros comprenden, consisten fundamentalmente en, o consisten en una pluralidad de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis de unión a inmunoglobulina (unidades de polipéptidos), según se define en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente. El uso de multímeros puede aumentar la capacidad de unión a inmunoglobulinas, y los multímeros también pueden tener una estabilidad alcalina mayor que los monómeros. El multímero puede ser, por ejemplo, un dímero, un trímero, un tetramero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero o un nonámero. El multímero puede ser un homomultímero, en el que todas las unidades del multímero son idénticas, o puede ser un heteromultímero, en el que al menos una unidad se diferencia de las otras. De modo ventajoso, todas las unidades en el multímero son estables en álcalis, tal como por comprender las mutaciones/conservaciones descritas anteriormente. Los polipéptidos pueden estar conectados entre sí directamente mediante enlaces peptídicos entre los extremos C-terminal y N-terminal de los polipéptidos. Como alternativa, dos o más unidades en el multímero pueden estar conectadas por conectores que comprenden especies oligoméricas o poliméricas, tales como conectores que comprenden péptidos de hasta 25 o 30 aminoácidos, tal como 3-25 o 3-20 aminoácidos. Los conectores, por ejemplo, pueden comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia peptídica definida por, o que tiene al menos 90% de identidad o al menos 95% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en APKVDAKFDKE, APKVDNKFNKE, APKADNKFNKE, APKVFDKE, APAKFDKE, AKFDKE, APKVDA, VDAKFDKE, APKKFDKE, APK, APKYEDGVDAKFDKE y YEDG o, como alternativa, seleccionada del grupo que consiste en APKADNKFNKE, APKVFDKE, APAKFDKE, AKFDKE, APKVDA, VDAKFDKE, APKKFDKE, APKYEDGVDAKFDKE y YEDG. También pueden consistir fundamentalmente en una secuencia peptídica definida por, o que tiene al menos 90% de identidad o al menos 95% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en APKADNKFNKE, APKVFDKE, APAKFDKE, AKFDKE, APKVDA, VDAKFDKE, APKKFDKE, APK y APKYEDGVDAKFDKE. En algunas realizaciones, los conectores no consisten en los péptidos APKVDAKFDKE o APKVDNKFNKE, o, como alternativa, no consisten en los péptidos APKVDAKFDKE, APKVDNKFNKE, APKFNKE, APKFDKE, APKVDKE o APKADKE.

La naturaleza de dicho conector preferiblemente no debe desestabilizar la conformación espacial de las unidades de proteína. Esto puede lograrse, por ejemplo, evitando la presencia de prolina en los conectores. Además, dicho conector preferiblemente debe ser lo suficientemente estable en entornos alcalinos como para no alterar las propiedades de las unidades de proteína mutadas. Para este fin, resulta ventajoso que los conectores no contengan asparagina. También puede ser ventajoso que los conectores no contengan glutamina. El multímero puede comprender también, en el extremo N-terminal, una pluralidad de restos aminoácidos, por ejemplo, que se originan del proceso de clonación o que constituyen un residuo de una secuencia de señalización escindida. El número de restos aminoácidos adicionales puede ser, por ejemplo, de 20 o menor, tal como 15 o menor, tal como 10 o menor, o 5 o menor. Como ejemplo

específico, el multímero puede comprender una secuencia AQ, AQGT, VDAKFDKE, AQVDAKFDKE o AQGTVDAKFDKE en el extremo N-terminal.

En ciertas realizaciones, el multímero puede comprender o consistir fundamentalmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 80-87. Estas y otras secuencias adicionales se listan a continuación y se denominan como Originaria(Mutaciones)_n, en las que n es el número de unidades de monómero en un multímero.

5

SEQ ID NO 17 Zvar(Q9A,N11E,N43A)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SAALLAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 18 Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK
LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SAALLAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SAALLAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 19 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
SKEILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSV SKEILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 20 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 30 Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)4

AQGT VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRILAEAKR
YNDQAQPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ
SRILAEAKR YNDQAQPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF
IQKLKDEPSQ SRILAEAKR YNDQAQPK VDAKFDKEQQ KAFYEILKLP
NLTEEQRNAF IQKLKDEPSQ SRILAEAKR YNDQAQPKC

10

SEQ ID NO 31 Zvar(Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R)4

AQGT VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK
LNDQAQPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ
SRNLLAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP NLTEEQRNAF
IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ KAFYEILKLP
NLTEEQRNAF IQSLKDEPSQ SRNLLAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 32 Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 33 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)6

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
 SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
 IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
 NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ
 EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK
 VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
 LNDQAQPKC

SEQ ID NO 34 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK
 LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV
 SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
 IQSLKDEPSV SKAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
 NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SKAILAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 35 Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I)4

AQGT VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRAILAEAKK
 LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV
 SRAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF
 IQSLKDEPSV SRAILAEAKK LNDQAQPK VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP
 NLTEEQRNAF IQSLKDEPSV SRAILAEAKK LNDQAQPKC

SEQ ID NO 80 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con D2, A3 y K4
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPK VFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPKC**

SEQ ID NO 81 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con K58, V1 y D2
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAP AKFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPKC**

SEQ ID NO 82 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con P57, K58, V1, D2 y A3
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAP AKFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPKC**

SEQ ID NO 83 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con K4, F5, D6, K7 y E8
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPK VDAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPKC**

SEQ ID NO 84 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con A56, P57 y K58
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK LND**AQ**
VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPKC**

SEQ ID NO 85 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con V1, D2 y A3
en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPK KFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPKC**

SEQ ID NO 86 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con V1, D2, A3, K4, F5, D6, K7
y E8 en el conector delecionados

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPK AQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPKC**

SEQ ID NO 87 Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con YEDG insertado en el conector
entre K58 y V1

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPK YEDG VDAKFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
SKAILAEAKK LND**AQAPKC**

SEQ ID NO 88 Zvar2

VDAKFDKEAQ EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV SKAILAEAKK
LND**AQAPK VDAKFDKEAQ** EAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSV
SKAILAEAKK LND**AQAPKC**

En algunas realizaciones, el polipéptido y/o multímero, tal como se describió anteriormente, comprende, además, en el extremo C-terminal o N-terminal, uno o más elementos de acoplamiento, seleccionados del grupo que consiste en

uno o más restos cisteína, una pluralidad de restos lisina y una pluralidad de restos histidina. El elemento o elementos de acoplamiento también pueden estar emplazados dentro de 1-5 restos aminoácidos, tal como dentro de 1-3 o 1-2 restos aminoácidos desde el extremo C-terminal o N-terminal. El elemento de acoplamiento puede ser, por ejemplo, una única cisteína en el extremo C-terminal. El elemento o elementos de acoplamiento pueden conectarse directamente al extremo C- o N-terminal o pueden conectarse a través de un tramo que comprende hasta 15 aminoácidos, tal como 1-5, 1-10 o 5-10 aminoácidos. Este tramo preferiblemente debe ser lo suficientemente estable en entornos alcalinos como para no alterar las propiedades de la proteína mutada. Para este fin, resulta ventajoso que el tramo no contenga asparagina. También puede ser ventajoso que el tramo no contenga glutamina. Una ventaja de contar con una cisteína C-terminal es que puede lograrse el acoplamiento final de la proteína a través de la reacción del tiol de la cisteína con un grupo electrófilo sobre un soporte. Esto proporciona una excelente movilidad de la proteína acoplada, lo cual es importante para la capacidad de unión.

La estabilidad alcalina del polipéptido o multímero puede evaluarse acoplándolo a un chip de resonancia de plasmón de superficie (SPR), por ejemplo, a los chips detectores Biacore CM5 como se describe en los ejemplos, usando, por ejemplo, la química de acoplamiento de NHS o maleimida, y midiendo la capacidad de unión a inmunoglobulinas del chip, generalmente usando una IgG humana policlonal, antes y después de una incubación en disoluciones alcalinas a una temperatura especificada, por ejemplo, 22 +/- 2 °C. La incubación puede realizarse, por ejemplo, en NaOH 0,5 M durante una serie de ciclos de 10 min, tal como 100, 200 o 300 ciclos. La capacidad de la IgG de la matriz después de 100 ciclos de incubación de 10 min en NaOH 0,5 M a 22 +/- 2 °C puede ser al menos 55, tal como al menos 60, al menos 80 o al menos 90% de la capacidad de la IgG antes de la incubación. Como alternativa, la capacidad de la IgG remanente después de 100 ciclos para un mutante concreto medida como se indicó anteriormente puede compararse con la capacidad de IgG remanente para el polipéptido/multímero originario. En este caso, la capacidad de la IgG remanente para el mutante puede ser al menos 105%, tal como al menos 110%, al menos 125%, al menos 150% o al menos 200% del polipéptido/multímero originario.

Los dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina y/o sus multímeros pueden estar codificados por una secuencia de ácido nucleico, tal como una secuencia de ARN o una secuencia de ADN que codifica el polipéptido o multímero. Puede usarse un vector, como un plásmido, que además de la secuencia codificante comprende las secuencias señal requeridas, para la expresión del polipéptido o multímero. El vector puede comprender un ácido nucleico que codifica un multímero como se describió anteriormente, en el que los ácidos nucleicos separados que codifican cada unidad pueden tener secuencias de ADN homólogos o heterólogos.

Puede usarse un sistema de expresión, que comprende un ácido nucleico o un vector como se describió anteriormente, para la expresión del polipéptido o multímero. El sistema de expresión puede ser, por ejemplo, un sistema de células huésped procarióticas gram-positivas o gram-negativas, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus* sp. que se ha modificado para expresar el presente polipéptido o multímero. Como alternativa, el sistema de expresión puede ser un sistema de células huésped eucarióticas, como una levadura, por ejemplo *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*, o células de mamífero, por ejemplo, células CHO.

La matriz de separación comprende, consiste esencialmente o consiste en multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina como se ha descrito anteriormente, acoplados covalentemente a un soporte poroso.

La matriz de separación puede comprender al menos 11, tal como 11-21, 15-21 o 15-18 mg/ml de ligandos de unión a Fc unidos covalentemente a un soporte poroso, en la que:

a) los ligandos comprenden multímeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis,

b) el soporte poroso comprende partículas de polímeros reticulados que tienen una mediana ponderada por volumen del diámetro (d_{50,v}) de 56-70, tal como 56-66 micrómetros, y un peso de sólidos secos de 55-80, tal como 60-78 o 65-78 mg/ml. Las partículas de polímeros reticulados pueden tener además un tamaño de poro correspondiente a un valor de K_d de cromatografía de filtración en gel inversa de 0,69-0,85, tal como 0,70-0,85 o 0,69-0,80, para dextrano de P_m 110 kDa. Los multímeros pueden comprender, por ejemplo, tetrámeros, pentámeros, hexámeros o heptámeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis, tales como hexámeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis. La combinación de un alto contenido en ligando con un intervalo de tamaño de partícula, el intervalo de peso de sólidos secos y el intervalo de K_d opcional proporciona una alta capacidad de unión, por ejemplo, de modo que la capacidad de unión dinámica de remoción al 10% para la IgG sea de al menos 45 mg/ml, tal como al menos 50 o al menos 55 mg/ml a 2,4 min de tiempo de residencia. Como alternativa, o además, la capacidad de unión dinámica de remoción al 10% para la IgG puede ser al menos 60 mg/ml, tal como al menos 65, al menos 70 o al menos 75 mg/ml a 6 min de tiempo de residencia.

Los multímeros de dominios de proteína A estabilizados frente a álcalis son muy selectivos para la IgG, y la matriz de separación puede tener, de forma adecuada, una constante de disociación para la IgG2 humana menor que 0,2 mg/ml, tal como menor que 0,1 mg/ml, en tampón fosfato 20 mM, NaCl 180 mM, pH 7,5. Esto puede determinarse según el método de isoterma de adsorción descrito en N. Pakiman *et al.*, J. Appl. Sci., 12, 1136-1141 (2012).

En ciertas realizaciones, la matriz de separación comprende al menos 15, tales como 15-21 o 15-18 mg/ml de ligandos de unión a Fc acoplados covalentemente a un soporte poroso, donde los ligandos comprenden multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali. Estos multímeros pueden ser adecuadamente como se describe en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente o como se especifica a continuación.

- 5 En algunas realizaciones, la matriz de separación comprende 5-25, como 5-20 mg/ml, 5-15 mg/ml, 5-11 mg/ml o 6-11 mg/ml del polipéptido o multímero acoplado al soporte.

La cantidad de polipéptido/multímero acoplado puede controlarse mediante la concentración de polipéptido/multímero utilizada en el proceso de acoplamiento, mediante las condiciones de activación y acoplamiento utilizadas y/o mediante la estructura de poros del soporte utilizado. Como regla general, la capacidad de unión absoluta de la matriz aumenta con la cantidad de polipéptido/multímero acoplado, al menos hasta un punto en el que los poros se estrechan significativamente por el polipéptido/multímero acoplado. Sin estar ligado a la teoría, parece sin embargo que para los valores de K_d enumerados para el soporte, la constricción de los poros por el ligando acoplado es de menor importancia. La capacidad de unión relativa por mg de polipéptido/multímero acoplado disminuirá a altos niveles de acoplamiento, dando como resultado un coste-beneficio óptimo dentro de los intervalos especificados anteriormente.

- 10 Tal matriz de separación es útil para la separación de inmunoglobulinas u otras proteínas que contienen Fc y, debido a la estabilidad alcalina mejorada de los polipéptidos/multímeros, la matriz soportará condiciones altamente alcalinas durante la limpieza, lo cual es esencial para el uso repetido a largo plazo en un entorno de separación de bioprocesos. La estabilidad alcalina de la matriz se puede evaluar midiendo la capacidad de unión a inmunoglobulina, típicamente utilizando IgG humana policlonal, antes y después de la incubación en disoluciones alcalinas a una temperatura específica, por ejemplo, $22 \pm 2^\circ\text{C}$. La incubación puede realizarse, por ejemplo, en NaOH 0,5 M o 1,0 M durante una serie de ciclos de 15 min, como 100, 200 o 300 ciclos, correspondientes a un tiempo total de incubación de 25, 50 o 75 h. La capacidad de IgG de la matriz después de 96-100 ciclos de incubación de 15 min o un tiempo total de incubación de 24 o 25 h en NaOH 0,5 M a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ puede ser de al menos 80, como al menos 85, al menos 90 o al menos 95% de la capacidad de IgG antes de la incubación. La capacidad de la matriz después de un tiempo total de incubación de 24 h en NaOH 1,0 M a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ puede ser de al menos 70, como al menos 80 o al menos 90% de la capacidad de IgG antes de la incubación. La capacidad de unión dinámica de remoción del 10% ($Q_{b10\%}$) para IgG a los 2,4 min o 6 min de tiempo de residencia puede reducirse, por ejemplo, en menos del 20% después de una incubación de 31 h en una disolución acuosa de NaOH 1,0 M a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

- 15 Como comprenderán los expertos en la técnica, el polipéptido o multímero expresado debe purificarse en la medida adecuada antes de inmovilizarse sobre un soporte. Dichos métodos de purificación son bien conocidos en el campo, y la inmovilización de ligandos basados en proteínas sobre soportes se lleva a cabo fácilmente usando métodos convencionales. Los métodos y los soportes adecuados se analizarán a continuación con más detalle.

- El soporte poroso de la matriz de separación puede ser de cualquier tipo conocido adecuado. Una matriz de separación por afinidad convencional suele ser de naturaleza orgánica y se basa en polímeros que exponen una superficie hidrófila al medio acuoso utilizado, es decir, exponen grupos hidroxilo (-OH), carboxi (-COOH), carboxamido (-CONH₂, posiblemente en formas N-sustituidas), amino (-NH₂, posiblemente en forma sustituida), oligo- o polietilenoxi sobre sus superficies externas y, si están presentes, también sobre las internas. La porosidad del soporte se puede expresar como un valor de K_{av} o K_d (la fracción del volumen de poro disponible para una molécula de sonda de un tamaño particular) medido por cromatografía de exclusión de tamaño inversa, por ejemplo, según los métodos descritos en Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, 1991, pp. 6-13. K_{av} se determina como la proporción $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, en la que V_e es el volumen de elución de una molécula de sonda (por ejemplo, dextrano 110 kDa), V_0 es el volumen vacío de la columna (por ejemplo, el volumen de elución de un marcador de vacío de Pm alto, como el dextrano bruto) y V_t es el volumen total de la columna. K_d se puede determinar como $(V_e - V_0)/V_i$, en la que V_i es el volumen de elución de una sal (por ejemplo, NaCl) capaz de acceder a todo el volumen excepto al volumen de la matriz (el volumen ocupado por las moléculas del polímero de la matriz). Por definición, los valores de K_d y K_{av} siempre se encuentran dentro del intervalo de 0-1. El valor de K_{av} puede ser ventajosamente de 0,6-0,95, por ejemplo, 0,7-0,90 o 0,6-0,8, medido con dextrano de Pm 110 kDa como molécula de sonda. El valor de K_d medido con dextrano de Pm 110 kDa puede ser adecuadamente 0,68-0,90, tal como 0,68-0,85 o 0,70-0,85. Una ventaja de esto es que el soporte tiene una gran fracción de poros capaces de alojar tanto los polipéptidos/multímeros de la invención como las inmunoglobulinas que se unen a los polipéptidos/multímeros y proporciona un transporte masivo de las inmunoglobulinas hacia y desde los sitios de unión.

- Los polipéptidos o multímeros se pueden unir al soporte poroso a través de técnicas de acoplamiento convencionales utilizando, por ejemplo, grupos tiol, amino y/o carboxi presentes en el ligando. Los bisepóxidos, la epíclorhidrina, CNBr, la N-hidroxisuccinimida (NHS), etc., son reactivos de acoplamiento bien conocidos. Entre el soporte y el polipéptido/multímero se puede introducir una molécula conocida como espaciador, que mejora la disponibilidad del polipéptido/multímero y facilita el acoplamiento químico del polipéptido/multímero al soporte. Dependiendo de la naturaleza del polipéptido/multímero y de las condiciones de acoplamiento, el acoplamiento puede ser un acoplamiento de múltiples puntos (por ejemplo, a través de una pluralidad de lisinas) o un acoplamiento de un solo punto (por ejemplo, a través de una sola cisteína).

En determinadas realizaciones, los polipéptidos o multímeros se acoplan al soporte a través de enlaces tioéter. Los métodos para realizar dicho acoplamiento son bien conocidos en este campo y los expertos en la técnica pueden realizarlos fácilmente utilizando técnicas y equipos convencionales. Los enlaces tioéter son flexibles y estables y generalmente adecuados para su uso en la cromatografía de afinidad. En particular, cuando el enlace tioéter es a través de un resto cisteína terminal o casi terminal en el polipéptido o multímero, se mejora la movilidad del polipéptido/multímero acoplado, lo que proporciona una capacidad de unión y una cinética de unión mejoradas. En algunas realizaciones, el polipéptido/multímero se acopla a través de una cisteína C-terminal proporcionada en la proteína como se describió anteriormente. Esto permite un acoplamiento eficaz del tiol de la cisteína a grupos electrofílicos, por ejemplo, grupos epóxido, grupos halohidrina, etc. sobre un soporte, dando como resultado un acoplamiento de puente de tioéter. En determinadas realizaciones, el soporte comprende un polímero polihidroxilado, como un polisacárido. Los ejemplos de polisacáridos incluyen, por ejemplo, dextrano, almidón, celulosa, pululano, agar, agarosa, etc. Los polisacáridos son inherentemente hidrófilos con bajos grados de interacciones no específicas, proporcionan un alto contenido de grupos hidroxilo reactivos (activables) y generalmente son estables frente a las disoluciones de limpieza alcalinas utilizadas en el bioprocesamiento.

En algunas realizaciones, el soporte comprende agar o agarosa. Los soportes utilizados en la presente invención se pueden preparar fácilmente de acuerdo con métodos convencionales, como la gelificación de suspensión inversa (S. Hjertén, *Biochim. Biophys. Acta*, 79(2), 393-398 (1964)). Como alternativa, las matrices base son productos disponibles comercialmente, como esferas de agarosa reticulada comercializadas con el nombre de SEPHAROSE™ FF (GE Healthcare). En una realización, especialmente ventajosa para separaciones a gran escala, se ha adaptado el soporte para aumentar su rigidez utilizando los métodos descritos en los documentos US6602990 o US7396467 y, por lo tanto, la matriz será más adecuada para caudales elevados.

En determinadas realizaciones, el soporte, como un soporte de polímero, polisacárido o agarosa, está reticulado, como con reticulaciones de hidroxialquil éter. Los reactivos de entrecruzamiento que producen dichos entrecruzamientos pueden ser, por ejemplo, epihalohidrinatos, como epiclorhidrina, diepóxidos, como butanodiol diglicidil éter, reactivos de alilación, como haluros de alilo o alil glicidil éter. La reticulación es beneficiosa para la rigidez del soporte y mejora la estabilidad química. Las reticulaciones de hidroxialquil éter son estables a los álcalis y no provocan una adsorción inespecífica significativa.

Como alternativa, el soporte poroso se basa en polímeros sintéticos, como poli(alcohol vinílico), acrilatos de polihidroxialquilo, metacrilatos de polihidroxialquilo, poliacrilamidas, polimetacrilamidas, etc. En caso de los polímeros hidrófobos, tales como matrices basadas en bencenos sustituidos con divinilo o monovinilo, a menudo la superficie de la matriz se hidrofiliiza para exponer los grupos hidrofílicos como se definió anteriormente a un líquido acuoso circundante. Dichos polímeros se producen fácilmente de acuerdo con métodos convencionales, véase, por ejemplo, "Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R. Arshady, *Chimica e L'Industria*, 70(9), 70-75 (1988)). Como alternativa, se usa un producto disponible en el mercado, como SOURCE™ (GE Healthcare). En otra alternativa, el soporte poroso según la invención comprende un soporte de naturaleza inorgánica, por ejemplo, sílice, óxido de circonio, etc.

En otra realización más, el soporte sólido tiene otra forma, como una superficie, un chip, capilares o un filtro (por ejemplo, una membrana o una matriz de filtro de profundidad).

En cuanto a la forma de la matriz según la invención, en una realización la matriz tiene forma de monolito poroso. En una realización alternativa, la matriz está en forma de esferas o partículas que pueden ser porosas o no porosas. Las matrices en forma de esferas o de partículas se pueden usar como un lecho cargado o en forma suspendida. Las formas suspendidas incluyen las conocidas como lechos expandidos y suspensiones puras, en las que las partículas o esferas pueden moverse libremente. En el caso de los monolitos, los lechos cargados y los lechos expandidos, el procedimiento de separación suele seguir a la cromatografía convencional con un gradiente de concentración. En caso de suspensiones puras, se utilizará el modo discontinuo.

La matriz de separación, como se describió anteriormente, tiene una excelente alcalina y se puede limpiar y/o desinfectar utilizando un líquido de limpieza alcalino. El método de limpieza y/o desinfección de la matriz de separación comprende las siguientes etapas:

a) opcionalmente purificar una mezcla que comprende una primera inmunoglobulina usando la matriz de separación;

b) proporcionar un líquido de limpieza que comprende al menos un 50% en volumen de una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino; y

c) limpiar y/o desinfectar la matriz de separación poniendo en contacto el líquido de limpieza con la matriz de separación durante un tiempo de contacto predeterminado.

La limpieza y/o desinfección se puede realizar en una matriz de separación que no se haya utilizado previamente para desinfectar la matriz antes de su uso, por ejemplo, después de cargar una columna que comprende la matriz de separación por primera vez. La limpieza y/o desinfección también se puede realizar después de usar la matriz de separación para purificar una inmunoglobulina, es decir, la etapa a) del método anterior. Las etapas de utilización de

- la matriz de separación para purificar una inmunoglobulina y limpiar y/o desinfectar la matriz de separación después pueden repetirse para maximizar el uso de la matriz de separación. Las etapas pueden repetirse al menos 10 veces, como al menos 50 veces o 50-200 veces. La etapa c) de limpieza/desinfección se puede realizar después de cada etapa a) de purificación de una inmunoglobulina, o se puede realizar con menos frecuencia, como después de cada segunda purificación o después de cada décima purificación. La etapa c) de limpieza y/o desinfección de la matriz de separación no necesita realizarse en las mismas condiciones cada vez. Por ejemplo, la matriz de separación se puede limpiar después de cada etapa de purificación utilizando un primer conjunto de condiciones, y después de cada enésima purificación se desinfecta utilizando condiciones más rigurosas.
- Debido a que las disoluciones acuosas de hidróxido de metal alcalino son agentes de limpieza efectivos y bactericidas en sí mismas, al limpiar y desinfectar usando un líquido de limpieza que comprende tales disoluciones acuosas de hidróxido de metal alcalino, existe una menor necesidad de usar alcoholes como agentes de limpieza y desinfección. Los hidróxidos de metales alcalinos son relativamente baratos en comparación con los alcoholes y están sujetos a una menor carga regulatoria. Además, no son inflamables y son más fáciles de desechar.
- La matriz de separación es una matriz de separación como se describió anteriormente, que comprende multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente a un soporte poroso, en la que los dominios de proteína A estabilizados con álcali comprenden mutantes de un dominio de unión a Fc parental de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA), como se define por SEQ ID NO 51 o SEQ ID NO 52, en la que los restos aminoácidos en las posiciones 13 y 44 de SEQ ID NO 51 o 52 son asparaginas, y en la que al menos el resto asparagina en la posición 3 de SEQ ID NO 51 o 52 se ha mutado a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina, valina, alanina, histidina y arginina. Los dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina pueden comprender mutaciones adicionales. Por ejemplo, el resto glutamina en la posición 1 de SEQ ID NO 51 o 52 puede mutarse a una alanina; y/o el resto asparagina o ácido glutámico en la posición 35 de SEQ ID NO 51 o 52 puede mutarse a una alanina.
- Debido a la alta estabilidad alcalina de los dominios de proteína A estabilizados con álcali, la matriz de separación puede tolerar extensos procedimientos de limpieza y desinfección, incluso utilizando disoluciones concentradas de hidróxido de metal alcalino, sin una pérdida excesiva de la capacidad de unión. Por ejemplo, la matriz de separación puede conservar al menos el 80% de su capacidad de unión dinámica original después de la limpieza y/o desinfección.
- El líquido de limpieza comprende al menos un 50% en volumen de una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino. La disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino puede comprender un solo hidróxido de metal alcalino o una mezcla de hidróxidos de metal alcalino, como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o una mezcla de hidróxido de sodio e hidróxido de potasio. La disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino puede tener una molaridad de 500 mM a 5 M, tal como de 1 M a 2 M, expresada como la concentración total combinada de hidróxidos de metal alcalino si se usa una mezcla de hidróxidos de metal alcalino. El líquido de limpieza puede consistir esencialmente o consistir en la disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino. Sin embargo, el líquido de limpieza en algunas realizaciones también puede comprender otros componentes. Dichos componentes adicionales pueden incluir alcoholes, como un alcohol C₂-C₇, tal como etanol, isopropanol o alcohol benzoico. Dichos componentes adicionales pueden incluir sales, como cloruro de sodio. El uso de alcoholes y/o sales en el líquido de limpieza puede aumentar la eficacia del líquido de limpieza para inhibir o inactivar ciertos microorganismos, como bacterias formadoras de esporas.
- Los ejemplos no limitantes de líquidos de limpieza incluyen:
- Disolución de hidróxido de sodio (0,5 M, 1 M, 2 M o 5 M);
 - Disolución de hidróxido de potasio (0,5 M, 1 M, 2 M o 5 M);
 - Disolución de hidróxido de sodio (0,5 M, 1 M, 2 M o 5 M) con etanol al 10-20% en volumen;
 - Disolución de hidróxido de sodio (0,5 M, 1 M, 2 M o 5 M) con isopropanol al 10-50% en volumen;
 - Disolución de hidróxido de sodio (0,5 M, 1 M, 2 M o 5 M) con alcohol bencílico al 1-5% en volumen;
 - Disolución de hidróxido de potasio (0,5 M, 1 M, 2 M o 5 M) con etanol al 10-20% en volumen;
 - Disolución de hidróxido de potasio (0,5 M, 1 M, 2 M o 5 M) con isopropanol al 10-50% en volumen; o
 - Disolución de hidróxido de potasio (0,5 M, 1 M, 2 M o 5 M) con alcohol bencílico al 1-5% en volumen.
- El uso de una disolución de hidróxido de metal alcalino relativamente concentrada, como una disolución de 0,5 M-5 M, proporciona una eliminación excepcional de los contaminantes de la matriz, como proteínas y ácidos nucleicos, así como una inactivación rápida y eficaz de virus, bacterias, levaduras y hongos. Una medición comúnmente aplicada de la eficacia de la desinfección es una reducción de 6-log₁₀ en el microorganismo o contaminante que se está midiendo. La desinfección con una disolución concentrada de hidróxido de metal alcalino es capaz de proporcionar una reducción de 6-log₁₀ en la mayoría de los microorganismos y endotoxinas.

Durante la limpieza de la matriz de separación, el líquido de limpieza debe pasar a través de la matriz de separación con un caudal adecuado para eliminar los contaminantes de la matriz. Durante la desinfección, el líquido de limpieza se hace pasar inicialmente a través de la matriz de separación con un caudal adecuado hasta que la matriz de separación se impregna completamente con el líquido de limpieza. El líquido de limpieza se hace pasar preferiblemente a través de la matriz de separación con un caudal adecuado durante toda la duración de la etapa de desinfección. Sin embargo, si se desea, el flujo de líquido de limpieza a través de la matriz de separación se puede detener una vez que la matriz de separación esté completamente permeada con el líquido de limpieza. Esto reduce el volumen de fluido de limpieza requerido para realizar una etapa de desinfección, pero proporciona una peor limpieza de la matriz de separación en comparación con un procedimiento en el que se aplica un flujo constante de fluido de limpieza.

Debido a que las disoluciones acuosas de hidróxido de metal alcalino son tan eficaces para eliminar los contaminantes de la matriz de separación, la matriz de separación puede usarse como una plataforma de purificación para la purificación de una diversidad de inmunoglobulinas, con un menor riesgo de arrastre o contaminación de proteínas de la célula huésped. Después de la purificación de un primer producto de inmunoglobulina, la matriz de separación primero se limpia y se desinfecta minuciosamente usando un líquido de limpieza que comprende una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino antes del uso en la purificación del segundo producto de inmunoglobulina.

Ejemplos

Mutagénesis de proteínas

Se realizó una mutagénesis dirigida específica de sitio mediante una PCR en dos etapas usando oligonucleótidos que codifican las mutaciones. Se empleó como molde un plásmido que contenía un único dominio de Z, B o C. Los fragmentos de PCR se acoplaron en un vector de expresión de *E. coli*. Se utilizó la secuenciación del ADN para verificar la secuencia correcta de los fragmentos insertados.

Para formar multímeros de los mutantes, se usó un sitio Acc I emplazado en los codones de inicio (GTA GAC) del dominio B, C o Z, que corresponde con los aminoácidos VD. El vector para el dominio monomérico se digirió con Acc I y se trató con fosfatasa. Se diseñaron cebadores de extremos pegajosos de Acc I específicos para cada variante y se generaron dos productos PCR solapantes a partir de cada molde. Los productos de PCR se purificaron y se calculó la concentración comparando los productos de PCR en un gel de agarosa al 2%. Se hibridaron cantidades equivalentes de los productos de PCR apareados (90 °C -> 25 °C en 45 min) en tampón de acoplamiento. El producto resultante consiste en aproximadamente ¼ de fragmentos que probablemente se acoplen en un sitio Acc I (fragmentos de PCR correctos y/o el vector digerido). Después del acoplamiento y la transformación, las colonias se seleccionaron mediante PCR para identificar las construcciones que contenían el mutante deseado. Los clones positivos se verificaron mediante secuenciación de ADN.

Expresión de construcciones y purificación

Las construcciones se expresaron en el periplasma bacteriano mediante fermentación de *E. coli* K12 en medio convencional. Después de la fermentación, las células se trataron con calor para liberar el contenido del periplasma hacia el medio. Las construcciones liberadas hacia el medio se recuperaron mediante microfiltración con una membrana que tenía un tamaño de poro de 0,2 µm.

Cada construcción, ahora en la forma de permeado procedente de la etapa de filtración, se purificó mediante afinidad. El permeado se cargó sobre un medio de cromatografía que contenía IgG inmovilizada (IgG Sepharose 6FF, GE Healthcare). El producto cargado se lavó con disolución salina tamponada con fosfato y se eluyó disminuyendo el pH.

La reunión de elución se ajustó a un pH neutro (pH 8) y se redujo mediante la adición de ditiotreitól. Después la muestra se cargó sobre un intercambiador aniónico. Después de una etapa de lavado, la construcción se eluyó en un gradiente de NaCl para separarla de cualquier contaminante. La reunión de elución se concentró mediante ultrafiltración hasta 40-50 mg/ml. Debe advertirse que el éxito de la purificación de afinidad de una construcción sobre un medio con IgG inmovilizada indica que la construcción en cuestión tiene una alta afinidad por IgG.

Los ligandos purificados se analizaron con RPC LC-MS para determinar la pureza y para asegurar que el peso molecular se corresponde con el esperado (basándose en la secuencia de aminoácidos).

Ejemplo 1

Los ligandos monoméricos purificados listados en la tabla 1, que comprenden además para SEQ ID NO 8-16, 23-28 y 36-48 una secuencia conductora AQGT en el N-terminal y una cisteína en el C-terminal, se inmovilizaron sobre chips detectores Biacore CM5 (GE Healthcare, Suecia) usando el kit de acoplamiento de aminos de GE Healthcare (para el acoplamiento de carbodiimida de aminos sobre los grupos carboximetilo sobre el chip) en una cantidad suficiente para obtener una potencia de señal de aproximadamente 200-1500 RU en un instrumento de resonancia de plasmón de superficie ("surface plasmon resonance", SPR) Biacore (GE Healthcare, Suecia). Para comprobar la capacidad de

unión a IgG de la superficie inmovilizada, se hizo fluir 1 mg/ml de IgG policlonal humana (Gammanorm) sobre el chip y se registró la potencia de la señal (proporcional a la cantidad de unión). Después la superficie se limpió en el sitio (CIP), es decir, se enjuagó con NaOH 500 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente (22 +/- 2 °C). Esto se repitió para 96-100 ciclos y se siguió la estabilidad alcalina del ligando inmovilizado como la capacidad de unión a IgG remanente (potencia de la señal) después de cada ciclo. Los resultados se muestran en la tabla 1 e indican que al menos los ligandos Zvar(N11K)1, Zvar(N11E)1, Zvar(N11Y)1, Zvar(N11T)1, Zvar(N11F)1, Zvar(N11L)1, Zvar(N11W)1, ZN11I)1, Zvar(N11M)1, Zvar(N11V)1, Zvar(N11A)1, Zvar(N11H)1, Zvar(N11R)1, Zvar(N11E,Q32A)1, Zvar(N11E,Q32E,Q40E)1 and Zvar(N11E,Q32E,K50R)1, Zvar(Q9A,N11E,N43A)1, Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)1, Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)1, Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1, Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)1, Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1, Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1, Zvar(N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1, Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1 y Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R)1, así como las variedades de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 que contienen G, S, Y, Q, T, N, F, L, W, I, M, V, D, E, H, R o K en la posición 29, las variedades de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 que contienen F, Y, W, K o R en la posición 53, y las variedades de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 en las que Q9, Q40, A42 o N43 han sido deletados, tienen una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura originaria Zvar1, usada como referencia. Además, los ligandos B(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 y C(Q9A,N11E,E43A)1 presentan una estabilidad mejorada en comparación con los dominios B y C originarios, usados como referencias.

Tabla 1. Ligandos monoméricos, evaluados mediante Biacore (NaOH 0,5 M).

Ligando	Secuencia	Capacidad después de 96-100 ciclos	Capacidad de referencia después de 96-100 ciclos	Capacidad con relación a la referencia
Zvar(N11E,Q32A)1	SEQ ID NO 12	57%	55%	1,036
Zvar(N11E)1	SEQ ID NO 13	59%	55%	1,073
Zvar(N11E,Q32E,Q40E)1	SEQ ID NO 14	52%	51%	1,020
Zvar(N11E,Q32E,K50R)1	SEQ ID NO 15	53%	51%	1,039
Zvar(N11K)1	SEQ ID NO 16	62%	49%	1,270
Zvar(N11Y)1	SEQ ID NO 38	55%	46%	1,20
Zvar(N11T)1	SEQ ID NO 39	50%	46%	1,09
Zvar(N11F)1	SEQ ID NO 40	55%	46%	1,20
Zvar(N11L)1	SEQ ID NO 41	57%	47%	1,21
Zvar(N11W)1	SEQ ID NO 42	57%	47%	1,21
Zvar(N11I)1	SEQ ID NO 43	57%	47%	1,21
Zvar(N11M)1	SEQ ID NO 44	58%	46%	1,26
Zvar(N11V)1	SEQ ID NO 45	56%	46%	1,22
Zvar(N11A)1	SEQ ID NO 46	58%	46%	1,26
Zvar(N11H)1	SEQ ID NO 47	57%	46%	1,24
Zvar(N11R)1	SEQ ID NO 48	59%	46%	1,28
Zvar(Q9A,N11E,N43A)1	SEQ ID NO 8	70%	47%	1,49
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)1	SEQ ID NO 9	68%	47%	1,45
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)1	SEQ ID NO 10	67%	47%	1,43
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 11	66%	47%	1,40
Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 24	65%	48%	1,35
Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1	SEQ ID NO 23	67%	46%	1,46
Zvar(Q9A,N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)1	SEQ ID NO 25	59%	46%	1,28

Zvar(N11K,H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1	SEQ ID NO 26	59%	45%	1,31
Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I)1	SEQ ID NO 27	63%	45%	1,40
Zvar(Q9A, N11K, H18K, D37E, A42R, N43A, L44I, K50R)1	SEQ ID NO 28	67%	45%	1,49
B(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 36	39%	35%	1,11
C(Q9A,N11E,E43A)1	SEQ ID NO 37	60%	49%	1,22
Zvar(Q9A,N11E, A29G ,Q40V,A42K,N43 A,L44I)1	SEQ ID NO 54	69%	48%	1,44
Zvar(Q9A,N11E, A29S ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 55	66%	48%	1,38
Zvar(Q9A,N11E, A29Y ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 56	61%	48%	1,27
Zvar(Q9A,N11E, A29Q ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 57	60%	47%	1,28
Zvar(Q9A,N11E, A29T ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 1	SEQ ID NO 58	60%	47%	1,28
Zvar(Q9A,N11E, A29N ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 59	61%	47%	1,30
Zvar(Q9A,N11E, A29F ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 60	62%	46%	1,35
Zvar(Q9A,N11E, A29L ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 61	61%	46%	1,33
Zvar(Q9A,N11E, A29W ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 62	60%	46%	1,30
Zvar(Q9A,N11E, A29I ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 63	58%	47%	1,23
Zvar(Q9A,N11E, A29M ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 64	62%	47%	1,32
Zvar(Q9A,N11E, A29V ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 65	62%	47%	1,32
Zvar(Q9A,N11E, A29D ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 66	56%	47%	1,19
Zvar(Q9A,N11E, A29E ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 67	57%	47%	1,21
Zvar(Q9A,N11E, A29H ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 1	SEQ ID NO 68	57%	47%	1,21
Zvar(Q9A,N11E, A29R ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 69	58%	46%	1,26
Zvar(Q9A,N11E, A29K ,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 70	59%	46%	1,28
Zvar(Q9A,N 11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, D53F) 1	SEQ ID NO 71	58%	46%	1,26
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, D53Y)1	SEQ ID NO 72	59%	46%	1,28
Zvar(Q9A,N 11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, D53W) 1	SEQ ID NO 73	62%	46%	1,35
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, D53K)1	SEQ ID NO 74	65%	46%	1,41
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I, D53R)1	SEQ ID NO 75	60%	46%	1,30
Zvar(Q9del ,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 76	60%	46%	1,30
Zvar(Q9A,N11E, Q40del ,A42K,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 77	59%	46%	1,28
Zvar(Q9A,N11E,Q40V, A42del ,N43A,L44I)1	SEQ ID NO 78	57%	46%	1,24
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K, N43del ,L44I) 1	SEQ ID NO 79	55%	46%	1,20

El experimento Biacore también puede usarse para determinar las constantes de unión y disociación entre el ligando e IgG. Esto se usó con la configuración según se describió anteriormente y con un anticuerpo monoclonal IgG1 como molécula de sonda. Para el Zvar1 de referencia, la constante de unión ($10^5 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$) fue de 3,1 y la constante de disociación (10^5s^{-1}) fue de 22,1, que producen una afinidad (constante de disociación/constante de unión) de 713 pM. Para Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)1 (SEQ ID NO. 11), la constante de unión fue de 4,1 y la constante de disociación fue de 43,7, con una afinidad de 1070 pM. Por tanto, la afinidad por IgG fue algo mayor en el variante mutado.

Ejemplo 2

Los ligandos diméricos, tetraméricos y hexaméricos purificados listados en la tabla 2 se inmovilizaron sobre chips detectores Biacore CM5 (GE Healthcare, Suecia) usando el kit de acoplamiento de aminas de GE Healthcare (para el acoplamiento de carbodiimida de aminas sobre los grupos carboximetilo sobre el chip) en una cantidad suficiente para obtener una potencia de señal de aproximadamente 200-1500 RU en un instrumento Biacore (GE Healthcare, Suecia). Para comprobar la capacidad de unión a IgG de la superficie inmovilizada, se hizo fluir 1 mg/ml de IgG policlonal humana (Gammanorm) sobre el chip y se registró la potencia de la señal (proporcional a la cantidad de unión).

Después la superficie se limpió en el sitio (CIP), es decir, se enjuagó con NaOH 500 mM durante 10 minutos a temperatura ambiente (22 +/- 2 °C). Esto se repitió para 300 ciclos y se siguió la estabilidad alcalina del ligando inmovilizado como la capacidad de unión a IgG remanente (potencia de la señal) después de cada ciclo. Los resultados se muestran en la tabla 2 y en la figura 2, e indican que al menos los ligandos Zvar(Q9A,N11E,N43A)4, Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4, Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)4 y Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4, Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4 y Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I)4 presentan una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura originaria Zvar4, que se usó como referencia. El ligando hexamérico Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)6 también presentó una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura originaria Zvar6, usada como referencia. Además, los dímeros de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I) con deleciones de a) D2,A3,K4; b) K58,V1,D2; c) P57,K58,V1,D2,A3; d) K4,F5,D6,K7,E8; e) A56,P57,K58; V1,D2,A3 o f) V1,D2,A3,K4,F5,D6,K7,E8 de la región de conector entre las dos unidades monoméricas presentan una estabilidad alcalina mejorada en comparación con la estructura originaria Zvar2, usada como referencia. Además, los dímeros de Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I) con una inserción de YEDG entre K58 y V1 en la región de conector presentan una estabilidad alcalina mejorada en comparación con Zvar2.

Tabla 2. Ligandos diméricos, tetraméricos y hexaméricos evaluados mediante Biacore (NaOH 0,5 M).

Ligando	SEQ ID NO:	Capacidad remanente 100 ciclos (%)	Capacidad con relación a la ref. 100 ciclos	Capacidad remanente 200 ciclos (%)	Capacidad con relación a la ref. 200 ciclos	Capacidad remanente 300 ciclos (%)	Capacidad con relación a la ref. 300 ciclos
Zvar4	21	67	1	36	1	16	1
Zvar(Q9A,N11E,N43A)4	17	81	1,21	62	1,72	41	2,56
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4	18	80	1,19	62	1,72	42	2,62
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)4	19	84	1,25	65	1,81	48	3,00
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	20	90	1,34	74	2,06	57	3,56
Zvar(Q9A,N11E,N28A,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	32	84	1,24	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)6	33	87	1,30	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	34	81	1,13	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,D37E,Q40V,A42R,N43A,L44I)4	35	84	1,17	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con D2, A3 y K4 en el conector delecionados	80	70	1,27	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con K58, V1 y D2 en el conector delecionados	81	76	1,38	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con P57, K58, V1, D2 y A3 en el conector delecionados	82	74	1,35	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con K4, F5, D6, K7 y E8 en el conector delecionados	83	70	1,30	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con A56, P57 y K58 en el conector delecionados	84	68	1,26	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado

Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con V1, D2 y A3 en el conector deleccionados	85	75	1,39	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con V1, D2, A3, K4, F5, D6, K7 y E8 en el conector deleccionados	86	62	1,13	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)2 con YEDG insertado en el conector entre K58 y V1	87	72	1,31	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Zvar2	88	55	1	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado

Ejemplo 3

Se repitió el ejemplo 2 con 100 ciclos de CIP de tres ligandos usando NaOH 1 M en lugar de 500 mM como en el ejemplo 2. Los resultados se muestran en la tabla 3 y demuestran que los tres ligandos presentan una estabilidad alcalina mejorada también en NaOH 1 M, en comparación con la estructura originaria Zvar4 que se usó como referencia.

Tabla 3. Ligandos tetraméricos, evaluados mediante Biacore (NaOH 1 M).

Ligando	Secuencia	Capacidad remanente 100 ciclos (%)	Capacidad con relación a la ref. 100 ciclos
Zvar4	SEQ ID NO 21	27	1
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4	SEQ ID NO 18	55	2,04
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43E,L44I)4	SEQ ID NO 19	54	2,00
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	SEQ ID NO 20	56	2,07

Ejemplo 4

Los ligandos tetraméricos purificados de la tabla 2 (todos con una cisteína N-terminal adicional) se inmovilizaron sobre esferas de agarosa usando los métodos descritos a continuación y se evaluaron para la capacidad y la estabilidad. Los resultados se muestran en la tabla 4 y en la figura 3.

Tabla 4. Matrices con ligandos tetraméricos, evaluados en columnas (NaOH 0,5 M).

Ligando	SEQ ID NO	Contenido en ligando (mg/ml)	Capacidad de IgG Qb10 inicial (mg/ml)	Capacidad de IgG Qb10 remanente después de seis ciclos de 4 h (mg/ml)	Capacidad de IgG remanente después de seis ciclos de 4 h (%)	Capacidad de retención con relación a la ref. después de seis ciclos de 4 h
Zvar4	21	7	52,5	36,5	60	1
Zvar4	21	12	61,1	43,4	71	1
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4	18	7,0	49,1	44,1	90	1,50
Zvar(Q9A,N11E,N28A,N43A)4	18	12,1	50,0	46,2	93	1,31
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	20	7,2	49,0	44,2	90	1,50
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	20	12,8	56,3	53,6	95	1,34
Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)4	30	9,7	56,3	52,0	92	1,53
Zvar(Q9A,N11K,H18K,D37E,A42R)4	31	10,8	56,9	52,5	92	1,30

Activación

La base de matriz usada fue de esferas de agarosa reticuladas rígidas con una mediana del diámetro (ponderada por volumen, d50V) de 85 micrómetros, preparada según los métodos del documento US6602990 y con un tamaño de poro correspondiente a un valor de K_{av} de 0,70 para dextrano de P_m 110 kDa medido mediante una cromatografía de filtración en gel inversa, según los métodos descritos en Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology 1991, pp. 6-13.

Se mezclaron 25 mL (g) de la base de matriz drenada, 10,0 mL de agua destilada y 2,02 g de NaOH (s) en un matraz de 100 mL con agitación mecánica durante 10 min a 25 °C. Se añadieron 4,0 mL de epíclorohidrina, y la reacción se desarrolló durante 2 horas. El gel activado se lavó con 10 volúmenes de sedimento de gel (GV) de agua.

Acoplamiento

A 20 mL de una disolución de ligando (50 mg/mL) en un tubo Falcon de 50 ml se le añadieron 169 mg de NaHCO_3 , 21 mg de Na_2CO_3 , 175 mg de NaCl y 7 mg de EDTA. El tubo Falcon se colocó en una mesa rodante durante 5-10 min, y después se añadieron 77 mg de DTE. La reducción se desarrolló durante >45 min. Después la disolución de ligando se desaló en una columna PD10 cargada con Sephadex G-25. El contenido en ligando de la disolución desalada se determinó midiendo la absorción de UV a 276 nm.

El gel activado se lavó con 3-5 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM, pH 8,6} y después el ligando se acopló según el método descrito en el documento US6399750.

Todos los tampones usados en los experimentos habían sido desgasificados con nitrógeno gaseoso durante al menos 5-10 min. El contenido en ligando de los geles puede controlarse variando la cantidad y la concentración de la disolución de ligando.

Después de la inmovilización, los geles se lavaron 3xGV con agua destilada. Los geles + 1 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM/tioglicerol al 10%, pH 8,6} se mezclaron y los tubos se dejaron en una mesa de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Después los geles se lavaron alternativamente con 3xGV {TRIS 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 8,6} y Hac 0,5 M Hac y después 8-10xGV con agua destilada. Se enviaron muestras del gel a un laboratorio externo para el análisis de aminoácidos y se calculó el contenido en ligando (mg/ml de gel) a partir del contenido en aminoácidos total.

Proteínas

Gammanorm 165 mg/ml (Octapharma), diluido hasta 2 mg/ml en tampón de equilibrio.

Tampón de equilibrio

PBS tampón fosfato 10 mM + NaCl 0,14 M + KCl 0,0027 M, pH 7,4 (Medicago)

Tampón de adsorción

PBS tampón fosfato 10 mM + NaCl 0,14 M + KCl 0,0027 M, pH 7,4 (Medicago)

Tampones de elución

Acetato 100 mM, pH 2,9

Capacidad de unión dinámica

Se cargaron 2 ml de resina en columnas TRICORN™ 5/100. Se determinó la capacidad de remoción con un sistema ÄKTAExplorer 10 a un tiempo de residencia de 6 minutos (0,33 ml/min de caudal). Se hizo pasar tampón de equilibrio a través de la columna de desviación hasta que se obtuvo una línea de base estable. Esto se realizó antes del establecimiento del cero automático. La muestra se aplicó a una columna hasta que se obtuvo una señal de UV del 100%. Después se volvió a aplicar tampón de equilibrio hasta que se obtuvo una línea de base estable.

La muestra se cargó en la columna hasta que alcanzó una señal de UV del 85% de absorbancia máxima. Después la columna se lavó con 5 volúmenes de columna (VC) de tampón de equilibrio a un caudal de 0,5 ml/min. La proteína se eluyó con 5 VC de tampón de elución a un caudal de 0,5 ml/min. Después, la columna se limpió con NaOH 0,5 M a un caudal de 0,2 ml/min y se reequilibró con tampón de equilibrio.

Para el cálculo de la capacidad de remoción al 10% se usó la siguiente ecuación, que es la cantidad de IgG que se carga en la columna hasta que la concentración de IgG en el efluente de la columna sea 10% de la concentración de IgG en la alimentación.

$$q_{10\%} = \frac{C_0}{V_c} \left[V_{app} - V_{sys} - \int_{V_{sys}}^{V_{app}} \frac{A(V) - A_{sub}}{A_{100\%} - A_{sub}} * dv \right]$$

$A_{100\%}$ = 100% de la señal UV;

A_{sub} = contribución a la absorbancia de la subclase IgG que no se une;

$A(V)$ = absorbancia a un volumen aplicado dado;

5 V_c = volumen de columna;

V_{app} = volumen aplicado hasta una remoción del 10%;

V_{sys} = volumen muerto del sistema;

C_0 = concentración de la alimentación.

10 Se calculó la capacidad de unión dinámica (DBC) a una remoción del 10%. Se calculó la capacidad de unión dinámica (DBC) para una remoción del 10 y 80%.

CIP - NaOH 0,5 M

15 Se determinó la DBC de remoción al 10% (Qb10) antes y después de exposiciones repetidas a disoluciones de limpieza alcalinas. Cada ciclo incluyó una etapa de CIP con NaOH 0,5 M bombeado a través de la columna a un caudal de 0,5/min durante 20 min, tras lo cual la columna se dejó en reposo durante 4 h. La exposición se realizó a temperatura ambiente (22 +/- 2 °C). Después de esta incubación, la columna se lavó con tampón de equilibrio durante 20 min a un caudal de 0,5 ml/min. La tabla 4 muestra la capacidad remanente después de seis ciclos de 4 h (es decir, un tiempo de exposición acumulado de 24 h a NaOH 0,5 M), en números absolutos y con relación a la capacidad inicial.

Ejemplo 5

20 Se repitió el ejemplo 4 con los ligandos tetraméricos mostrados en la tabla 5, pero se usó NaOH 1,0 M en las etapas de CIP en lugar de 0,5 M. Los resultados se muestran en la tabla 5 y en la figura 4.

Tabla 5. Matrices con ligandos tetraméricos, evaluados en columnas - NaOH 1,0 M.

Ligando	SEQ ID NO	Contenido en ligando (mg/ml)	Capacidad de IgG Qb10 inicial (mg/ml)	Capacidad de IgG Qb10 remanente después de seis ciclos de 4 h (mg/ml)	Capacidad de IgG remanente después de seis ciclos de 4 h (%)	Capacidad de retención con relación a la ref. después de seis ciclos de 4 h
Zvar4	21	12	60,1	33,5	56	1
Zvar(Q9A,N11E,Q40V,A42K,N43A,L44I)4	20	12,8	60,3	56,0	93	1,67
Zvar(N11K,H18K,S33K,D37E,A42R,N43A,L44I,K50R,L51Y)4	30	9,7	62,1	48,1	77	1,44

Ejemplo 6

Bases de matrices

25 Las bases de matrices usadas fueron un conjunto de muestras de esferas de agarosa reticuladas rígidas con una mediana del diámetro (ponderada por volumen, d50V) de 59-93 micrómetros (determinada en un instrumento de difracción de láser a Malvern Mastersizer 2000), preparadas según los métodos del documento US6602990 y con un tamaño de poro correspondiente a un valor de Kd de 0,62-0,82 para dextrano de Pm 110 kDa medido mediante una cromatografía de filtración en gel inversa, según los métodos descritos anteriormente, usando columnas HR10/30 (GE Healthcare) cargadas con los prototipos en NaCl 0,2 M y con una gama de fracciones de dextrano como moléculas de sonda (caudal 0,2 ml/min). El peso seco de las muestras de esferas variaba de 53 a 86 mg/ml, según se determina
30 secando 1,0 ml de muestras de tortas de filtro drenadas a 105 °C a lo largo de la noche y después pesándolas.

Tabla 6. Muestras de bases de matrices

Base de matriz	Kd	d50v (µm)	Peso seco (mg/ml)
A18	0,704	59,0	56,0
A20	0,70	69,2	55,8
A27	0,633	87,2	74,2
A28	0,638	67,4	70,2
A29	0,655	92,6	57,5
A32	0,654	73,0	70,5
A33	0,760	73,1	55,5
A38	0,657	70,9	56,2
A39	0,654	66,0	79,1
A40	0,687	64,9	74,9
A41	0,708	81,7	67,0
A42	0,638	88,0	59,4
A43	0,689	87,5	77,0
A45	0,670	56,6	66,0
A52	0,620	53,10	63,70
A53	0,630	52,6	86,0
A54	0,670	61,3	75,3
A55	0,640	62,0	69,6
A56	0,740	61,0	56,0
A56-2	0,740	51,0	56,0
A62a	0,788	48,8	70,1
A62b	0,823	50,0	46,9
A63a	0,790	66,8	59,6
A63b	0,765	54,0	79,0
A65a	0,796	58,0	60,0
A65b	0,805	57,3	46,0
B5	0,793	69,0	84,4
C1	0,699	71,0	73,4
C2	0,642	66,5	81,1
C3	0,711	62,0	82,0
C4	0,760	62,0	82,0
H31	0,717	82,0	59,0
H35	0,710	81,1	61,0
H40	0,650	52,8	65,0
I1	0,640	50,0	67,0
41	0,702	81,6	60,6

Acoplamiento

Se lavaron 100 ml de base de matriz con 10 volúmenes de gel de agua destilada sobre un filtro de vidrio. El gel se pesó (1 g = 1 ml) y se mezcló con 30 ml de agua destilada y 8,08 g de NaOH (0,202 mol) en un matraz de 250 ml con un agitador. La temperatura se ajustó a 27 +/- 2 °C en un baño de agua. Se añadieron 16 ml de epíclorohidrina (0,202 mol) con agitación vigorosa (aproximadamente 250 rpm) durante 90 +/- 10 minutos. Se dejó que la reacción se desarrollase durante 80 +/- 10 minutos más y después el gel se lavó con >10 volúmenes de gel de agua destilada

sobre un filtro de vidrio hasta que se alcanzó un pH neutro. Este gel activado se usó directamente para el acoplamiento como se indica a continuación.

5 A 16,4 mL de una disolución de ligando (50 mg/mL) en un tubo Falcon de 50 ml se le añadieron 139 mg de NaHCO_3 , 17,4 mg de Na_2CO_3 , 143,8 mg de NaCl y 141 mg de EDTA. El tubo Falcon se colocó en una mesa rodante durante 5-10 min, y después se añadieron 63 mg de DTE. La reducción se desarrolló durante >45 min. Después la disolución de ligando se desaló en una columna PD10 cargada con Sephadex G-25. El contenido en ligando de la disolución desalada se determinó midiendo la absorción de UV a 276 nm.

10 El gel activado se lavó con 3-5 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM, pH 8,6} y después el ligando se acopló según el método descrito en el documento US6399750 5.2.2, aunque con unas cantidades de ligando considerablemente mayores (véase a continuación). Todos los tampones usados en los experimentos habían sido desgasificados con nitrógeno gaseoso durante al menos 5-10 min. El contenido en ligando de los geles se controló variando la cantidad y la concentración de la disolución de ligando, añadiendo 5-20 mg de ligando por ml de gel. El ligado era un tetrámero (SEQ ID NO. 20) o un hexámero (SEQ ID NO. 33) de un mutante estabilizado frente a álcalis.

15 Después de la inmovilización, los geles se lavaron 3xGV con agua destilada. Los geles + 1 GV {fosfato 0,1 M/EDTA 1 mM/tioglicerol al 10%, pH 8,6} se mezclaron y los tubos se dejaron en una mesa de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Después los geles se lavaron alternativamente con 3xGV {TRIS 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 8,6} y Hac 0,5 M Hac y después 8-10xGV con agua destilada. Se enviaron muestras del gel a un laboratorio externo para el análisis de aminoácidos y se calculó el contenido en ligando (mg/ml de gel) a partir del contenido en aminoácidos total.

Evaluación

20 Se determinó la capacidad dinámica Qb10% para una IgG humana policlonal a 2,4 y 6 min de tiempo de residencia como se indica en el ejemplo 4.

Tabla 7. Resultados del prototipo

Prototipo	Base de matriz	Contenido en ligando (mg/ml)	Multímero	Qb10% 2,4 min (mg/ml)	Qb10% 6 min (mg/ml)
N1	A38	7,45	tetrámero	44,4	58,25
N2	A20	7,3	tetrámero	45,12	57,21
N3	A42	6,72	tetrámero	33,56	50,02
N4	A29	7,3	tetrámero	36,34	51,8
N5	A28	7,9	tetrámero	42,38	58,25
N6	A39	6,96	tetrámero	41,88	54,67
N7	A27	7,5	tetrámero	29,19	48,73
N8	A43	6,99	tetrámero	33,43	49,79
N9	A38	11,34	tetrámero	48,1	72,78
N10	A20	10,6	tetrámero	50,66	70,07
N11	A42	11,1	tetrámero	32,25	57,78
N12	A29	11	tetrámero	34,85	64,68
N13	A28	11,9	tetrámero	39,92	63,75
N14	A39	10,48	tetrámero	44,37	64,79
N15	A27	12,1	tetrámero	24,8	55,56
N16	A43	10,51	tetrámero	31,82	58,04
N17	A41	8,83	tetrámero	38,5	56,8
N18	A41	8,83	tetrámero	37,84	58,6
N19	A41	8,83	tetrámero	35,06	57,23
N20	A41	5,0	tetrámero	35,64	46,04
N21	A41	13,0	tetrámero	34,95	62,23
N22	A40	13,15	tetrámero	56,85	71,09

ES 2 909 833 T3

Prototipo	Base de matriz	Contenido en ligando (mg/ml)	Multímero	Qb10% 2,4 min (mg/ml)	Qb10% 6 min (mg/ml)
N23	A33	7,33	tetrámero	48,69	55,76
N24	A40	11,03	tetrámero	54,96	73,8
033A	A38	7,5	tetrámero	44	58
033B	A38	11,3	tetrámero	48	73
097A	A20	7,3	tetrámero	45	57
097B	A20	10,6	tetrámero	51	70
003A	A28	7,9	tetrámero	42	58
003B	A28	11,9	tetrámero	40	64
003C	A28	15,8	tetrámero	37	67
038A	A39	7,0	tetrámero	42	55
038B	A39	10,5	tetrámero	44	65
074	A40	13,2	tetrámero	57	71
093	A33	7,3	tetrámero	49	56
058A	A40	11,0	tetrámero	55	74
077	A18	8,2	tetrámero	52	59
010	A32	10,7	tetrámero	40	57
099	A32	13,3	tetrámero	37	66
030A	B5	6,3	tetrámero	32	38
030B	B5	9,6	tetrámero	45	47
293A	C1	5,4	tetrámero	38	47
293B	C1	10,8	tetrámero	43	60
294A	C2	5,1	tetrámero	39	46
294B	C2	10,5	tetrámero	42	57
336A	H40	5,6	tetrámero	47	52
336B	H40	9,1	tetrámero	52	67
091	A18	13,4	tetrámero	N/A	63
092	A20	12,8	tetrámero	49	67
080	A33	9,4	tetrámero	51	58
089	A40	6,1	tetrámero	49	59
688A	A62a	6,6	tetrámero	41	46
688B	A62a	14,8	tetrámero	55	62
871	A62a	9,7	tetrámero	48	60
934A	A63a	6,6	tetrámero	40	44
934B	A63a	14,0	tetrámero	48	56
017B	A65a	13,1	tetrámero	56	64
041A	A62b	5,2	tetrámero	40	N/A
041B	A62b	11,1	tetrámero	52	N/A
116A	A65b	5,8	tetrámero	42	46
116B	A65b	8,8	tetrámero	49	56
017A	A65a	6,1	tetrámero	40	44
387A	A62a	6,4	tetrámero	43	45
387B	A62a	7,5	tetrámero	47	56

ES 2 909 833 T3

Prototipo	Base de matriz	Contenido en ligando (mg/ml)	Multímero	Qb10% 2,4 min (mg/ml)	Qb10% 6 min (mg/ml)
432	A63a	6,1	tetrámero	39	44
433A	A65a	6,6	tetrámero	42	47
433B	A65a	13,6	tetrámero	52	61
579A	I1	6,1	tetrámero	45	51
579B	I1	11,2	tetrámero	57	68
064A	C3	5,9	tetrámero	44	52
064B	C3	9,0	tetrámero	49	62
064C	C3	14,3	tetrámero	51	70
352A	C4	10,1	tetrámero	55	63
352B	C4	14,4	tetrámero	59	67
066A	C3	6,8	hexámero	48	59
066B	C3	11,9	hexámero	51	73
066C	C3	15,1	hexámero	43	61
353A	C4	11,2	hexámero	62	74
353B	C4	15,2	hexámero	57	82
872A	A62a	9,6	hexámero	56	72
872B	A62a	14,5	hexámero	62	84
869A	H40	6,9	hexámero	50	56
869B	H40	14,3	hexámero	56	75
869C	H40	23,0	hexámero	41	65
962A	H35	6,8	hexámero	36	49
962B	H35	12,3	hexámero	31	54
962C	H35	20,3	hexámero	20	43
112A	A56	7,9	hexámero	47	55
112B	A56	12,4	hexámero	57	73
112C	A56	19,2	hexámero	55	80
113A	A56	7,1	hexámero	48	57
113B	A56	12,4	hexámero	53	73
113C	A56	15,2	hexámero	48	76
212A	H31	6,5	hexámero	37	38
212B	H31	10,4	hexámero	50	61
212C	H31	20,0	hexámero	31	52
213A	A33	6,5	hexámero	44	53
213B	A33	10,9	hexámero	50	65
213C	A33	11,1	hexámero	50	68
432A	A20	6,4	hexámero	41	56
432B	A20	12,4	hexámero	38	64
432C	A20	21,1	hexámero	44	43
433A	A38	5,9	hexámero	47	57
433B	A38	11,6	hexámero	48	72
433C	A38	15,8	hexámero	36	62
742A	A54	6,7	hexámero	38	46

Prototipo	Base de matriz	Contenido en ligando (mg/ml)	Multímero	Qb10% 2,4 min (mg/ml)	Qb10% 6 min (mg/ml)
742B	A54	12,6	hexámero	45	52
742C	A54	21,1	hexámero	38	65
726A	A63b	6,4	hexámero	42	46
726B	A63b	10,6	hexámero	49	60
726C	A63b	16,7	hexámero	53	69
793A	A56-2	6,8	hexámero	50	58
793B	A56-2	12,5	hexámero	59	72
793C	A56-2	19,2	hexámero	61	82

Ejemplo 7

Una serie de prototipos, preparados como se indicó anteriormente, con diferente contenido en ligando (tetramero, SEQ ID NO:20) se incubaron en NaOH 1 M durante 4, 8 y 31 horas a 22 +/- 2 °C y se midió la capacidad de IgG dinámica (Qb10%, 6 min de tiempo de residencia) antes y después de la incubación. Los prototipos se muestran en la tabla 8 y los resultados en las figuras 5 y 6. Puede observarse que la estabilidad frente a este tratamiento riguroso con álcalis aumenta a medida que aumenta el contenido en ligando.

Tabla 8. Muestras para la incubación en NaOH 1 M

Prototipo	Contenido en ligando (mg/ml)	Qb10%, 6 min, antes de la incubación (mg/ml)
N1	12	78
LE28	13	79
N17	16	73
N16	20	73

Ejemplo 8

Se evaluaron, con una alimentación de mAb real, dos prototipos de esferas de agarosa reticuladas, preparadas como se indicó anteriormente, con diferente contenido de ligando (hexámero, SEQ ID NO:33), un diámetro medio de esferas (d_{50,v}) de 62 µm y una K_d 0,70 para dextrano de Pm 110 kD. El contenido de ligando del prototipo A fue de 14,3 mg/ml y del prototipo B de 18,9 mg/ml. A modo de comparación, se usó el producto comercial MabSelect SuRe® LX (GE Healthcare Life Sciences). Las resinas se cargaron en columnas Tricorn (GE Healthcare Life Sciences) a alturas de lecho de 10 cm, dando unos volúmenes de lecho de 2 ml y se demostró que las columnas tenían una asimetría máxima dentro del intervalo de 0,8-1,5. La muestra cargada era un sobrenadante de células CHO aclarado con 4,9 mg/ml de anticuerpo IgG1 monoclonal a pH fisiológico, y las condiciones experimentales se enumeran a continuación en la tabla 9 (VC = volúmenes de columna, TR = tiempo de residencia).

Tabla 9. Condiciones para evaluación con alimentación real

Equilibrio:	3 VC fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, TR = 3,4 min
Carga de muestra:	43 mg mAb/ml resina, TR = 6 min
Lavado 1:	5 VC fosfato 20 mM, NaCl 500 mM pH 7,4, 1,5 VC a TR = 6 min y 3,5 VC a TR = 3,4 min
Lavado 2:	1 VC acetato 50 mM pH 6,0, TR = 3,4 min
Elución:	3 VC acetato 50 mM pH 3,5, TR = 6 min, pico recogido entre 150 mAU-150 mAU
Tira:	2 VC acetato 100 mM, TR = 3,4 min
CIP:	3 VC NaOH 0,1 M, TR = 6 min
Reequilibrio:	5 VC fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, TR = 3,4 min

El pico de mAb se recogió utilizando una función de observación de UV y la concentración de mAb se determinó mediante medición UV a 280 nm (coeficiente de extinción 1,5). Todas las detecciones de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro, incluidas las medidas para los cálculos de rendimiento.

- 5 Las muestras para los análisis de HCP ("host cell protein", proteína de la célula huésped) se prepararon agregando tampón de conservación al 10% (NaH₂PO₄ 0,2 M*H₂O (al 5,3%), NaH₂PO₄ 0,2 M*12 H₂O (al 94,7%), Tween 20 al 0,5%, BSA al 1%, pH 8) a las muestras directamente después de cada prueba (por ejemplo, 50 µl de tampón de conservación por 450 µl de muestra). El contenido de HCP se midió utilizando anticuerpos anti-CHO comerciales (Cygnus Technologies) y una estación de trabajo Gyrolab (Gyros AB, Suecia).

- 10 Los resultados se presentan en la tabla 10 a continuación y muestran que la actuación de los prototipos está en el mismo intervalo que el del producto comercial. El contenido de HCP en la alimentación fue de 331 000 ppm.

Tabla 10. Resultados de la evaluación de la alimentación real

Resina	Rendimiento (%)	Grupo de elución (VC)	HCP en grupo (ppm)
MabSelect SuRe LX	90	1,5	914
MabSelect SuRe LX	95	1,6	1021
Prototipo A	96	1,3	1076
Prototipo A	95	1,3	1105
Prototipo B	96	1,3	1040
Prototipo B	93	1,3	1104

Ejemplo 9

- 15 Un prototipo de matriz de esferas de agarosa reticuladas, preparada como se indicó anteriormente, con 14,5 mg/ml de ligando (hexámero, SEQ ID NO:33), un diámetro medio de la esfera (d_{50,v}) de 57,4 µm, una K_d 0,72 para dextrano de Pm 110 kD y peso seco de 70,3 mg/ml, se evaluó para el pH de elución con dos alimentaciones de mAb reales (mAb1 2,4 g/l y mAb2 4,9 g/l), IgG1, pH fisiológico y una muestra de IgG humana policlonal (Gammanorm, Octapharma). A modo de comparación, se usó el producto comercial MabSelect SuRe® LX (GE Healthcare Life Sciences). Las resinas se cargaron en columnas Tricorn (GE Healthcare Life Sciences) a unas alturas de lecho de 10 cm, dando unos volúmenes de lecho de 2 ml, y se demostró que las columnas tenían una asimetría máxima dentro del intervalo de 0,8-1,5. Las muestras cargadas eran sobrenadantes de células CHO aclarados con mAb IgG1 a pH fisiológico, y las condiciones experimentales se enumeran a continuación en la tabla 11 (VC = volúmenes de columna, TR = tiempo de residencia).

Tabla 11. Condiciones para la evaluación del pH de elución

Equilibrio:	5 VC fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, TR = 3,4 min
Carga de muestra:	10 mg mAb/ml resina, TR = 6 min
Lavar:	6 VC fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, TR = 3,4 min
Elución:	30 VC citrato 100 mM gradiente de pH 6-3, TR = 6 min
CIP:	3 VC NaOH 0,1 M, TR = 6 min
Reequilibrio:	8 VC fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4, TR = 3,4 min

- 25 Los resultados se muestran a continuación en la tabla 12 e indican que los anticuerpos eluyen a niveles de pH similares a los de la referencia, aunque con alguna variación individual dependiendo de la combinación particular de anticuerpo-resina.

Tabla 12. Resultados de la evaluación del pH de elución

Muestra	pH de elución de MabSelect SuRe LX	pH de elución del prototipo
mAb 1	3,67	3,53
mAb 2	3,68	3,80

Muestra	pH de elución de MabSelect SuRe LX	pH de elución del prototipo
IgG policlonal	4,01 (pico 1)	4,24 (pico 1)
	3,70 (pico 2)	3,81 (pico 2)

Las fracciones de la elución en gradiente de pH de IgG policlonal también se analizaron con respecto al contenido de IgG1, IgG2 e IgG4, utilizando un instrumento Biacore SPR (GE Healthcare Life Sciences) con anticuerpos contra las cuatro clases diferentes de IgG inmovilizados sobre un chip CM5 Biacore.

- 5 Los cromatogramas para IgG policlonal en la referencia y el prototipo se muestran en la figura 7 y los análisis de clase de IgG se muestran en la figura 8. Los datos muestran que las tres clases se unen a ambas resinas de manera similar y que el primer pico contiene predominantemente IgG2, mientras que IgG1 e IgG4 eluyen principalmente en el segundo pico. Los anticuerpos anti-IgG3 reaccionaron de forma cruzada con IgG4, por lo que no se obtuvieron resultados fiables para IgG3. En general, se sabe que IgG3 no muestra unión a la proteína A o solo la muestra débilmente.

Ejemplo 10

- 10 Un prototipo de matriz de esferas de agarosa reticuladas, preparada como se indicó anteriormente, con 12,6 mg/ml de ligando (tetrámero, SEQ ID NO 20), un diámetro medio de esferas de 84,9 μm (d50,v), una Kd 0,71 para dextrano de Pm 110 kD y 62,2 mg/ml peso seco, se evaluó con respecto a la estabilidad alcalina, utilizando como referencia el producto comercial MabSelect SuRe LX. Las columnas Tricorn 5 cargadas con las resinas hasta una altura de lecho de 10 cm se lavaron con 3 volúmenes de columna de NaOH 1 M. Luego se detuvo el flujo durante 240 minutos
- 15 (correspondientes a 16 ciclos CIP normales de 15 min/ciclo) antes de lavar la disolución de NaOH con 3 volúmenes de columna de tampón PBS. Luego se midió la capacidad de unión dinámica para IgG policlonal (Gammanorm, Octapharma) y se repitió el proceso con otra inyección de NaOH 1 M. La capacidad dinámica se midió después de cada ciclo de incubación de 240 min con NaOH 1 M. En las mediciones de capacidad, las columnas se equilibraron con tampón PBS antes de cargar la muestra de 2 mg/ml (tiempo de residencia de 6 min) hasta que se alcanzó una
- 20 señal UV del 85% de la absorbancia máxima. Luego, la columna se lavó con tampón PBS, se eluyó con ácido acético 500 mM pH 3,0 y se volvió a equilibrar. La capacidad de unión dinámica al 10% y al 80% de remoción se calculó como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 9 y demuestran que el prototipo fue significativamente más estable que el producto comercial.

Ejemplo 11

- 25 Se ensayó la tolerancia de una matriz de separación según la invención a ciclos CIP repetidos usando NaOH 2 M. El ejemplo inventivo (Inv. Ej.) se comparó con el producto comercial MabSelect SuRe (MSS) como referencia. El estudio se realizó durante 50 ciclos con una configuración de cromatografía en contracorriente periódica (PCC) de 4 columnas ÄKTA de GE Healthcare.

- 30 Cada columna se cargó con una disolución de etanol al 20% + NaCl 0,2 M, con un flujo de 3,5 ml/min durante 10 min. Se quitaron el tubo de carga y el filtro superior y se colocó el adaptador en la parte superior de la columna. Después de un flujo de carga adicional de 3,5 ml/min durante 10 min, el adaptador se ajustó contra la superficie del lecho. El volumen de la columna cargada V_c para el ejemplo inventivo fue de 1,04 ml, en comparación con 1,02 ml para MabSelect SuRe.

A continuación, se ejecutó la configuración del PCC utilizando las siguientes condiciones:

Equilibrio:	3 volúmenes de columna (VC) fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4
Carga de muestra:	mAb 4,28 mg/ml; carga hasta el 35% de DBC de remoción; TR = 2,4 minutos
Lavado 1:	1,5 VC fosfato 20 mM, NaCl 500 mM pH 7,0 200 cm/h + 3,5 VC
Lavado 2:	1 VC acetato 50 mM pH 6,0
Elución:	3 VC acetato 50 mM pH 3,5
Banda:	2 VC ácido acético 100 mM pH 2,9
CIP:	3 VC NaOH 2 M (tiempo de contacto 15 min)
Reequilibrio:	10 VC fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4

- 35 Los resultados se muestran en la figura 10, en la que el volumen de carga al 35% de la capacidad de unión dinámica de remoción de cada matriz se normaliza en relación con su volumen de carga al 35% de DBC. Se puede observar que la referencia comercial MabSelect SuRe (MSS) pierde una proporción de su capacidad de unión a inmunoglobulinas en

cada ciclo y, después de 16 ciclos, le queda menos del 80% de su capacidad original. El ejemplo inventivo (Inv. Ej.), por otro lado, muestra poca pérdida en la capacidad de unión y sigue teniendo más del 95% de su capacidad de unión original después de 50 ciclos de CIP en NaOH 2 M, equivalente a un tiempo de contacto de 750 minutos.

Ejemplo 12

- 5 Se estudió la estabilidad del ligando frente a NaOH 1 M y 2 M para una matriz de separación según la invención, usando microscopía confocal. El ejemplo inventivo (Inv. Ej.) se comparó con el producto comercial MabSelect SuRe LX (MSS LX) como referencia. El estudio se realizó de la siguiente manera:

Preparación de la matriz de separación

- 10 Los geles de la matriz de separación se lavaron para cambiar su disolución de conservación a agua mediante centrifugación y se obtuvo una suspensión de gel 1:1. Para cada gel, se añadieron 2 ml de la suspensión 1:1 en agua a un tubo Falcon de 50 ml, se centrifugó y se decantó. A cada tubo se agregaron 19 ml de NaOH 1 M o 2 M (2 matrices de separación * 2 concentraciones de [NaOH] → 4 tubos en total). Los geles se incubaron a temperatura ambiente con agitación en un agitador Heidolph (1300 rpm). Se tomó una muestra de 1500 µl de suspensión de gel después de 2, 4, 6, 8, 16, 24 y 32 h de incubación y se lavó en tubos Eppendorf de 2 ml mediante centrifugación (13000 rpm, centrífuga Eppendorf). Las etapas de lavado fueron las siguientes:

2×1,8 ml agua MQ

1×1,8 ml de tampón HAc

2×1,8 ml tampón Tris

2×1,8 ml tampón PBS

- 20 Después de la decantación final, los geles se resuspendieron con 75 µl de tampón PBS para obtener suspensiones de gel y PBS aproximadamente 1:1.

Preincubación

- 25 Se intercambió una muestra de cada gel que no se había incubado en NaOH, es decir, la suspensión de gel y agua 1:1 original, para dar una suspensión de PBS 1:1. Se añadió una muestra de 16 µl de cada suspensión de gel a 500 µl de disolución de Cy5-hlgG (inmunoglobulina G humana marcada con Cy5) y se mezcló en un tambor vertical durante el fin de semana, a temperatura ambiente, cubierta con papel de aluminio.

Configuración del microscopio

- 30 Para el estudio se utilizó un microscopio confocal Leica SP8. Los ajustes del microscopio se determinaron usando el ejemplo inventivo y se verificaron usando MSS LX para asegurarse de que no se obtuviera saturación con ninguno de los geles.

Objetivo: 63x/130 Glyc 21C (Leica)

Láser: 638 nm

Ganancia del detector PTM: 629,6 V

Compensación del detector: -0,8%

- 35 Velocidad de escaneo: 400 Hz

Tamaño de fotograma: 512x512 píxeles

Fotograma promedio: 2

Experimento de cinética (adsorción de hlgG en geles en función del tiempo)

- 40 Se añadió una muestra de 15 µl de cada suspensión de gel 1:1 incubada y lavada con NaOH a 500 µl de Cy5-hlgG, dando una mezcla de >300 mg Ab/ml de gel. Estas mezclas se incubaron a temperatura ambiente en un agitador Heidolph a 1300 rpm. En tiempos predeterminados (5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos), se tomaron muestras de 15 µl y se tomaron imágenes usando el microscopio. Se integraron las imágenes confocales y se obtuvieron curvas de adsorción calculando la fluorescencia relativa, Q_{rel} , de cada esfera; véase la ecuación 1.

$$Q_{rel} = \frac{F_{ring/volumen} \cdot (r_{ext}^3 - r_{int}^3)}{r_{ext}^3} \quad (\text{ec. 1})$$

en la que r_{ext} y r_{int} indican el radio del límite exterior e interior de la región fluorescente de la esfera (determinado usando la herramienta de línea en el software del microscopio, LAS-X) y

$$F_{ring/volumen} = \frac{F_{ring}}{\frac{4}{3}\pi r_{ext}^3} \quad (\text{ec. 2})$$

- 5 donde F_{ring} es la fluorescencia total de la región fluorescente de la esfera, determinada con la herramienta circular en LAS-X.

Combinando la ecuación 1 y 2 se obtiene la ecuación 3:

$$Q_{rel} = \frac{F_{ring} \cdot (r_{ext}^3 - r_{int}^3)}{\frac{4}{3}\pi r_{ext}^6} \quad (\text{ec. 3}).$$

Este procedimiento se deriva del trabajo presentado en A. Ljunglöf, J. Thömmes, J. Chromatogr., A 813 (1998), 387-395.

10 Resultados, análisis y conclusiones

La fluorescencia relativa determinada Q_{rel} de las matrices de separación en función del tiempo después de la incubación en NaOH 1 M se muestran en las figuras 11a (MabSelect SuRe LX) y 11b (ejemplo inventivo). Puede verse que MSS LX (figura 11a) perdió aproximadamente el 50% de su capacidad de unión original y alcanza la saturación más rápido después de una incubación de 16 horas en NaOH 1 M, en comparación con la referencia (sin tratamiento con álcali, es decir, 0 horas). Después de la incubación durante 32 horas en NaOH 1 M, ha perdido aproximadamente toda la capacidad de unión a Ig. Por el contrario, la matriz de separación del ejemplo inventivo (figura 11b) es estable a la incubación en NaOH 1 M y mantiene su capacidad de unión original después de 32 horas de incubación en NaOH 1 M, dentro de la variación experimental.

20 La fluorescencia relativa determinada Q_{rel} de las matrices de separación en función del tiempo después de la incubación en NaOH 2 M se muestran en las figuras 12a (MabSelect SuRe LX) y 12b (ejemplo inventivo). Puede verse que la tasa de pérdida de capacidad para MSS LX (figura 12a) se acelera con la incubación en NaOH 2M. Después de una incubación de 8 horas, se pierde aproximadamente el 50% de la capacidad de unión a Ig, y después de una incubación de 16 horas en NaOH 2 M, se pierde más o menos toda la capacidad de unión a Ig. Por el contrario, el ejemplo inventivo (figura 12b) es relativamente estable frente al álcali y mantiene, al menos dentro de la variación experimental, su capacidad de unión original después de 16 h o menos de incubación en NaOH 2 M. Sin embargo, se puede ver que después de 24 h o más de incubación en NaOH 2 M, el ejemplo inventivo ha perdido capacidad de unión y que aproximadamente el 50% de la capacidad de unión se ha perdido después de 32 h de incubación. Además, la saturación se alcanza más rápido a medida que se pierde la capacidad de unión, lo que se ve más claramente con las muestras incubadas durante 32 h.

30 Estos resultados demuestran que la matriz de separación del ejemplo inventivo es significativamente más estable frente a los álcalis que MabSelect SuRe LX y parece resistir hasta 16 h de incubación con NaOH 2 M sin afectar significativamente el transporte de masa y la capacidad de unión.

Ejemplo 13

35 Se investigó la inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* usando varios líquidos de limpieza de acuerdo con la invención. El microorganismo formador de esporas *Bacillus subtilis* (ATCC n.º 6633) es conocido por estar entre los microorganismos más resistentes a la desinfección con NaOH. Se incubaron colonias de *B. subtilis* con diversos líquidos de limpieza (NaOH 1 M, NaOH 1 M con BnOH al 2% y NaOH 1 M con IPA al 40%) y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (CFU/ml) en diversos tiempos de incubación predeterminados. La figura 13 muestra los resultados del estudio en CFU/ml en función del tiempo de incubación y del líquido de limpieza. Se puede ver que el uso de NaOH 1 M por sí solo es insuficiente para inactivar completamente *B. subtilis* incluso después de 24 horas de desinfección. La adición de alcohol bencílico al 2% al líquido de limpieza no proporciona ninguna mejora significativa. Sin embargo, el uso de NaOH 1 M con alcohol isopropílico al 40% como líquido de limpieza permite la reducción de *B. subtilis* hasta por debajo de los niveles detectables después de 4 horas de tratamiento.

Listado de secuencias

<110> GE Healthcare Bioprocess R&D AB

5 <120> POLIPÉPTIDOS MUTADOS QUE SE UNEN A INMUNOGLOBULINA

<130> 315715

<160> 95

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 51

15

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn
1 5 10 15

Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
20 25 30

Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln
35 40 45

20

Ala Pro Lys
50

<210> 2

<211> 61

<212> PRT

25

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Lys Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu
35 40 45

30

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
50 55 60

<210> 3

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

35

<400> 3

ES 2 909 833 T3

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 4

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 5

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 5

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 6

ES 2 909 833 T3

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 7

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 8

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 9

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 10

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 10

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 11

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 11

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 12

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Ala
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 13

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 13

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 14

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 14

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Glu
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Glu Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 15

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Glu
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Arg Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 16

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 16

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 17

<211> 237

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 17

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala
1 5 10 15

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
20 25 30

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
50 55 60

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
85 90 95

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
130 135 140

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr
180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu Leu Ala
210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
225 230 235

5 <210> 18
<211> 237
<212> PRT
<213> Escherichia coli

10 <400> 18

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala
1 5 10 15

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala
20 25 30

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
50 55 60

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln Ser Leu
85 90 95

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
130 135 140

Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
145 150 155 160

Ser Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr
180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe
195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Ala Leu Leu Ala
210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
225 230 235

5 <210> 19
<211> 237
<212> PRT
<213> Escherichia coli

10 <400> 19

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala
 1 5 10 15
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
 20 25 30
 Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile
 35 40 45
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
 50 55 60
 Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 65 70 75 80
 Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
 85 90 95
 Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
 100 105 110
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
 115 120 125
 Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
 130 135 140
 Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
 145 150 155 160
 Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 165 170 175
 Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr
 180 185 190
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
 195 200 205
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala
 210 215 220
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
 225 230 235

5 <210> 20
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 20

ES 2 909 833 T3

Ala	Gln	Gly	Thr	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	1	5	10	15
Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	20	25	30	
Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Ile	35	40	45	
Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp	50	55	60	
Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	65	70	75	80
Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	85	90	95	
Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	100	105	110	
Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	115	120	125	
Ala	Gln	Glu	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	130	135	140	
Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	145	150	155	160
Ser	Lys	Ala	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	165	170	175	
Pro	Lys	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Phe	Tyr	180	185	190	
Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	195	200	205	
Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Ile	Leu	Ala	210	215	220	
Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Cys	225	230	235				

5 <210> 21
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 21

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala
 1 5 10 15
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
 20 25 30
 Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu
 35 40 45
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
 50 55 60
 Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
 65 70 75 80
 Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
 85 90 95
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
 100 105 110
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
 115 120 125
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
 130 135 140
 Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
 145 150 155 160
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 165 170 175
 Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 180 185 190
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
 195 200 205
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala
 210 215 220
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
 225 230 235

5 <210> 22
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 22

ES 2 909 833 T3

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 23

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 23

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 24

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 24

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 25

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 25

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 26

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 26

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 27

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 27

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 28

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 28

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Arg Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 29

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 29

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 30

<211> 237

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 30

ES 2 909 833 T3

Ala	Gln	Gly	Thr	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Gln	Gln	Lys	Ala	1	5	10	15
Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	20	25	30	
Ala	Phe	Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Glu	Pro	Ser	Gln	Ser	Arg	Ala	Ile	35	40	45	
Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Arg	Tyr	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp	50	55	60	
Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Gln	Gln	Lys	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Lys	65	70	75	80
Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Lys	Leu	85	90	95	
Lys	Asp	Glu	Pro	Ser	Gln	Ser	Arg	Ala	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Arg	100	105	110	
Tyr	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	115	120	125	
Gln	Gln	Lys	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	130	135	140	
Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Glu	Pro	Ser	Gln	145	150	155	160
Ser	Arg	Ala	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Arg	Tyr	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	165	170	175	
Pro	Lys	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Gln	Gln	Lys	Ala	Phe	Tyr	180	185	190	
Glu	Ile	Leu	Lys	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	195	200	205	
Ile	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Glu	Pro	Ser	Gln	Ser	Arg	Ala	Ile	Leu	Ala	210	215	220	
Glu	Ala	Lys	Arg	Tyr	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Cys	225	230	235				

5 <210> 31
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10 <400> 31

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala
1 5 10 15

Phe Tyr Glu Ile Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
20 25 30

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Asn Leu
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
50 55 60

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Lys
65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
85 90 95

Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
115 120 125

Ala Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu
130 135 140

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln
145 150 155 160

Ser Arg Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Lys Ala Phe Tyr
180 185 190

Glu Ile Leu Lys Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Arg Asn Leu Leu Ala
210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
225 230 235

5 <210> 32
<211> 237
<212> PRT
<213> Escherichia coli

10 <400> 32

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala
1 5 10 15

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala
20 25 30

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
50 55 60

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln Ser Leu
85 90 95

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
130 135 140

Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
145 150 155 160

Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr
180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe
195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala
210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
225 230 235

5 <210> 33
<211> 353
<212> **PRT**
<213> Escherichia coli

10 <400> 33

ES 2 909 833 T3

Ala	Gln	Gly	Thr	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala
1				5					10					15	
Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn
			20					25					30		
Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Ile
		35					40					45			
Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp
	50					55					60				
Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His
65					70					75					80
Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu
				85					90					95	
Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys
			100					105					110		

ES 2 909 833 T3

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
 115 120 125
 Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
 130 135 140
 Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
 145 150 155 160
 Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 165 170 175
 Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr
 180 185 190
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
 195 200 205
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala
 210 215 220
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys
 225 230 235 240
 Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
 245 250 255
 Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 260 265 270
 Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 275 280 285
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln
 290 295 300
 Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln
 305 310 315 320
 Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys
 325 330 335
 Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 340 345 350

Cys

<210> 34

<211> 237

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 34

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala
1 5 10 15

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
20 25 30

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
50 55 60

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
85 90 95

Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
130 135 140

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val
145 150 155 160

Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr
180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala
210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
225 230 235

5 <210> 35
<211> 237
<212> PRT
<213> Escherichia coli

10 <400> 35

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Gly Thr Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala
1 5 10 15

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn
20 25 30

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Arg Ala Ile
35 40 45

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
50 55 60

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
65 70 75 80

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
85 90 95

Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
100 105 110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu
115 120 125

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
130 135 140

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val
145 150 155 160

Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
165 170 175

Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr
180 185 190

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
195 200 205

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Arg Ala Ile Leu Ala
210 215 220

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
225 230 235

5 <210> 36
<211> 58
<212> PRT
<213> Escherichia coli

10 <400> 36

ES 2 909 833 T3

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 37

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 37

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 38

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 38

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Tyr Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 39

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 39

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Thr Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 40

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 40

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Phe Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 41

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 41

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Leu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 42

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 42

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Trp Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 43

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 43

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Ile Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 44

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 44

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Met Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 45

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 45

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Val Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 46

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 46

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 47

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 47

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln His Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 48

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 48

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Arg Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 49

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 49

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 50

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 50

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Glu Pro Ser Val Ser Arg Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 51

<211> 47

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 51

ES 2 909 833 T3

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
1 5 10 15

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln
20 25 30

Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
35 40 45

<210> 52

<211> 47

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 52

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
1 5 10 15

Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
20 25 30

10 Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
35 40 45

<210> 53

<211> 47

<212> PRT

15 <213> Escherichia coli

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)..(1)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (3)..(3)

25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (10)..(10)

30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (20)..(21)

35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (24)..(25)

40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (29)..(29)

45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (32)..(32)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

5 <222> (34)..(36)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

10 <222> (42)..(43)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<220>

<221> característica miscelánea

15 <222> (45)..(45)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 53

Xaa	Gln	Xaa	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	Xaa	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu
1				5					10					15	

Glu	Gln	Arg	Xaa	Xaa	Phe	Ile	Xaa	Xaa	Leu	Lys	Asp	Xaa	Pro	Ser	Xaa
			20					25					30		

Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Ala	Gln
			35					40				45		

20

<210> 54

<211> 58

<212> PRT

25 <213> Escherichia coli

<400> 54

Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
1				5					10					15	

Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln
			20					25					30		

Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala
			35				40					45			

Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys
		50				55			

30

<210> 55

<211> 58

<212> PRT

35 <213> Escherichia coli

<400> 55

Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
1				5					10					15	

Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ser	Phe	Ile	Gln
			20					25					30		

Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Ala	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala
			35				40					45			

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 <210> 56
 5 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 56
 10 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Tyr Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 <210> 57
 15 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 57
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gln Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 <210> 58
 20 <211> 58
 <212> PRT
 25 <213> Escherichia coli
 <400> 58
 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Thr Phe Ile Gln
 30

ES 2 909 833 T3

	20		25		30
	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala				
	35		40		45
	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys				
	50		55		
	<210> 59				
	<211> 58				
5	<212> PRT				
	<213> Escherichia coli				
	<400> 59				
	Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile				
	1		5		10
					15
	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Asn Phe Ile Gln				
	20		25		30
	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala				
	35		40		45
	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys				
10	50		55		
	<210> 60				
	<211> 58				
	<212> PRT				
15	<213> Escherichia coli				
	<400> 60				
	Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile				
	1		5		10
					15
	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Phe Phe Ile Gln				
	20		25		30
	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala				
	35		40		45
	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys				
20	50		55		
	<210> 61				
	<211> 58				
	<212> PRT				
	<213> Escherichia coli				
25	<400> 61				

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Leu Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 62

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 62

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Trp Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 63

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 63

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ile Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 64

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 64

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Met Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 65

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 65

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Val Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 66

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 66

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Asp Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 67

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 67

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Glu Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 68
<211> 58
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 68

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn His Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 69
<211> 58
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 69

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Arg Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 70
<211> 58
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 70

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 71

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 71

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Phe Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 72

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 72

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Tyr Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 73

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 73

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Trp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 74

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 74

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Lys Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 75

<211> 58

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 75

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Arg Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 76

<211> 57

<212> **PRT**

<213> Escherichia coli

<400> 76

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
1 5 10 15

His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser
20 25 30

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 77

<211> 57

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 77

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 78

<211> 57

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 78

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 79

<211> 57

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 79

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ile Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 80

<211> 114

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 80

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Phe Asp Lys Glu Ala
50 55 60

Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
85 90 95

Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys Cys

<210> 81

<211> 114

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 81

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala
50 55 60

Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
85 90 95

Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys Cys

5 <210> 82
<211> 114
<212> PRT
<213> Escherichia coli

10 <400> 82

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala
50 55 60

Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
85 90 95

Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys Cys

15 <210> 83
<211> 112
<212> PRT
<213> Escherichia coli

ES 2 909 833 T3

<400> 83

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Ala Gln Glu
50 55 60

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg
65 70 75 80

Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala
85 90 95

Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
100 105 110

<210> 84

<211> 114

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 84

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala
50 55 60

Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
65 70 75 80

Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
85 90 95

Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys Cys

<210> 85

<211> 114

<212> PRT

<213> Escherichia coli

ES 2 909 833 T3

<400> 85

5 Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asp Lys Glu Ala
50 55 60
Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu
65 70 75 80
Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser
85 90 95
Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
100 105 110

Lys Cys

<210> 86

<211> 109

10 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 86

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Gln Glu Ala Phe Tyr
50 55 60
Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe
65 70 75 80
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala
85 90 95

15 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys

100 105

<210> 87

ES 2 909 833 T3

<211> 121
<212> PRT
<213> Escherichia coli

5 <400> 87

```

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1          5          10          15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
          20          25          30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
          35          40          45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Tyr Glu Asp Gly Val Asp
          50          55          60

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
65          70          75          80

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
          85          90          95

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
          100          105          110

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys
          115          120

```

10 <210> 88
<211> 117
<212> PRT
<213> Escherichia coli

15 <400> 88

```

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1          5          10          15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
          20          25          30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
          35          40          45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp
          50          55          60

```

ES 2 909 833 T3

Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu
65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro
85 90 95

Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
100 105 110

Gln Ala Pro Lys Cys
115

<210> 89

<211> 55

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 89

Val Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 90

<211> 55

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 90

Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro
50 55

<210> 91

<211> 53

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 91

ES 2 909 833 T3

Val Asp Ala Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn
1 5 10 15

Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
20 25 30

Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
35 40 45

Ala Gln Ala Pro Lys
50

<210> 92

<211> 55

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 92

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
50 55

<210> 93

<211> 55

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 93

Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 94

<211> 50

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 94

ES 2 909 833 T3

Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu
1 5 10 15

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val
20 25 30

Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
35 40 45

Pro Lys
50

<210> 95

<211> 62

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 95

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Ala Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Tyr Glu Asp Gly
50 55 60

REIVINDICACIONES

1.- Un método para limpiar y desinfectar una matriz de separación que comprende multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente a un soporte poroso, en el que el método comprende las etapas de:

- 5 a) purificar una mezcla que comprende una primera inmunoglobulina utilizando la matriz de separación;
 - b) proporcionar un líquido de limpieza que comprende al menos un 50% en volumen de una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino;
 - c) limpiar y/o desinfectar la matriz de separación poniendo en contacto el líquido de limpieza con la matriz de separación durante un tiempo de contacto predeterminado; y
 - 10 d) purificar una mezcla que comprende una segunda inmunoglobulina usando la matriz de separación, en el que la segunda inmunoglobulina es diferente de la primera inmunoglobulina;
- en el que los dominios de la proteína A estabilizados con álcali comprenden mutantes de un dominio de unión a Fc parental de la proteína A (SpA) de *Staphylococcus*, como se define en la SEQ ID NO 51 o la SEQ ID NO 52, en los que los restos aminoácidos en las posiciones 13 y 44 de la SEQ ID NO 51 o 52 son asparaginas y en los que al menos
- 15 el resto asparagina en la posición 3 de SEQ ID NO 51 o 52 se ha mutado a un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, lisina, tirosina, treonina, fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano, metionina, valina, alanina, histidina y arginina, tales como ácido glutámico.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que los mutantes comprenden mutaciones adicionales en una o más de las posiciones 1, 2, 7, 10, 15, 20, 21, 24, 25, 28, 29, 32, 34, 35, 36, 39, 42 y 43 en SEQ ID NO 51 o 52.
- 20 3.- El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el resto glutamina en la posición 1 de SEQ ID NO 51 o 52 se ha mutado a una alanina y/o en el que el resto asparagina o ácido glutámico en la posición 35 de SEQ ID NO 51 o 52 tiene sido mutado a una alanina.
- 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina son homomultímeros seleccionados del grupo que
- 25 consiste en dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros o nonámeros.
- 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina comprenden cada uno un resto cisteína C-terminal para el acoplamiento covalente al soporte poroso y/o en el que los multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina se acoplan al soporte poroso a través de enlaces tioéter.
- 30 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la matriz de separación comprende al menos 11 mg/ml, tal como al menos 15 mg/ml, 15-21, 17-21 o 18-20 mg/ml de los multímeros de dominios de proteína A estabilizados con álcali que se unen a inmunoglobulina acoplados covalentemente al soporte poroso y/o en el que el soporte poroso son esferas de agarosa altamente reticuladas.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino es una disolución de hidróxido de sodio, una disolución de hidróxido de potasio o una mezcla de las mismas, preferiblemente una disolución de hidróxido de sodio.
- 35 8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino tiene una molaridad de 500 mM a 5 M, tal como de 1 M a 2 M.
- 9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el líquido de limpieza comprende además un alcohol C₂-C₇, tal como etanol, isopropanol o alcohol bencílico y/o en el que el líquido de limpieza comprende al menos un 70% en volumen de una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino, tal como al menos un 90% en volumen de una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino, preferentemente al menos un 99% en volumen de una disolución acuosa de hidróxido de metal alcalino.
- 40 10.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo de contacto predeterminado es un tiempo suficiente para proporcionar una reducción de 6-log₁₀ en la concentración de endotoxinas y/o concentración de microorganismos en la matriz de separación.
- 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo de contacto predeterminado es de 10 minutos a 50 horas, tal como de 30 minutos a 24 horas, o tal como de 1 hora a 12 horas.
- 45 12.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas a)-c) se repiten al menos 10 veces, tal como al menos 50 veces o 50-200 veces.
 - 50

13.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la matriz de separación conserva al menos el 80% de su capacidad de unión dinámica original después de la etapa c), tal como al menos el 90% de su capacidad de unión dinámica original.

Alineamiento de los dominios de unión a Fc

E	---	-----AQQ	NAFYQVLNMP	NLNADQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANVLGEAQK	LNSQAPK	51	(SEQ ID NO: 1)
D	ADA	QQKFNKDQQ	SAFYEILNMP	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	STNVLGEAKK	LNESQAPK	61	(SEQ ID NO: 2)
A	--A	DNN-FNKEQQ	NAFYEILNMP	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNESQAPK	58	(SEQ ID NO: 3)
B	---	ADNKFNKEQQ	NAFYEILHLP	NLNEEQRNGF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNSQAPK	58	(SEQ ID NO: 4)
C	---	ADNKFNKEQQ	NAFYEILHLP	NLTTEEQRNGF	IQSLKDDPSV	SKEILAEAKK	LNSQAPK	58	(SEQ ID NO: 5)
Z	---	VDNKFNKEQQ	NAFYEILHLP	NLNEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNSQAPK	58	(SEQ ID NO: 6)
Zvar	---	VDKFKDKEQQ	NAFYEILHLP	NLTTEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNSQAPK	58	(SEQ ID NO: 7)
	---	-----QQ	NAFYEILHLP	NLTTEEQRNAF	IQSLKDDPSQ	SANLLAEAKK	LNSQAPK	47	(SEQ ID NO: 51)
	---	-----QQ	NAFYEILHLP	NLTTEEQRNGF	IQSLKDDPSV	SKEILAEAKK	LNSQAPK	47	(SEQ ID NO: 52)
Pos	1	10	20	30	40	50	58		

Fig. 1

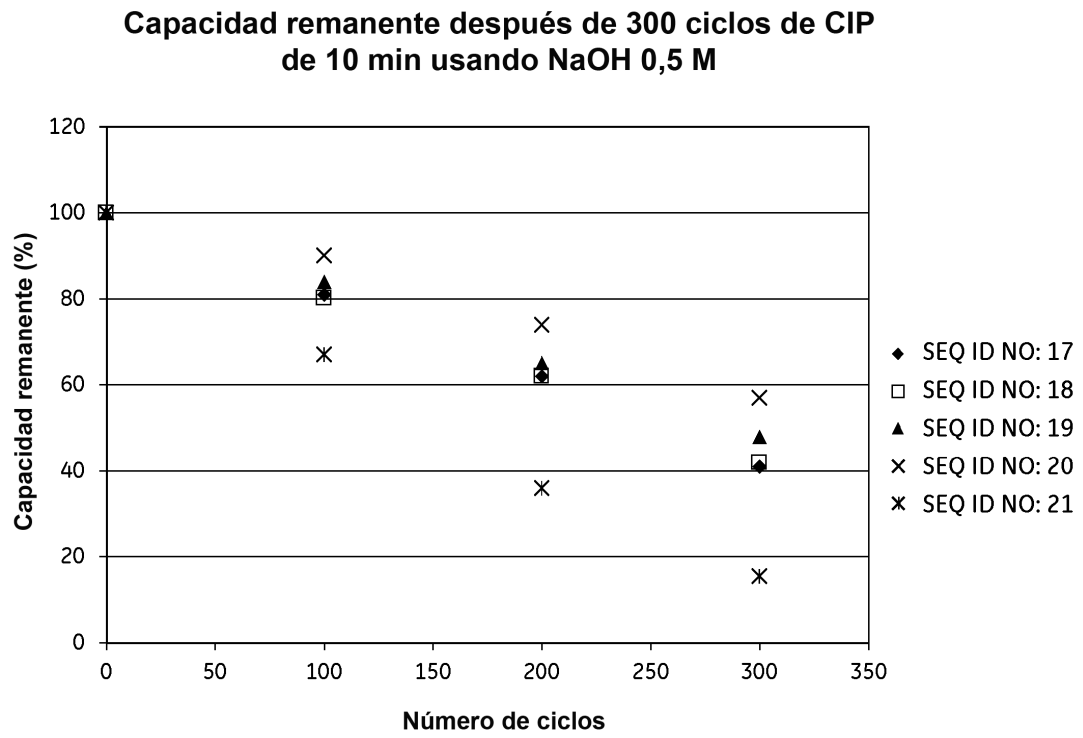


Fig. 2.

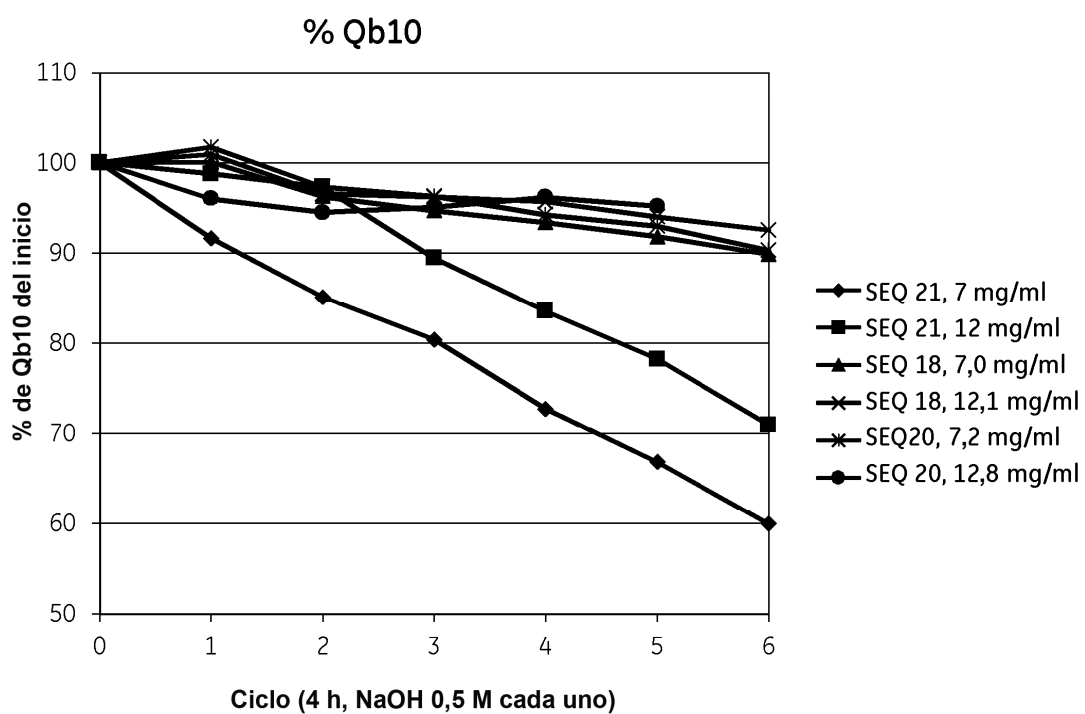


Fig. 3.

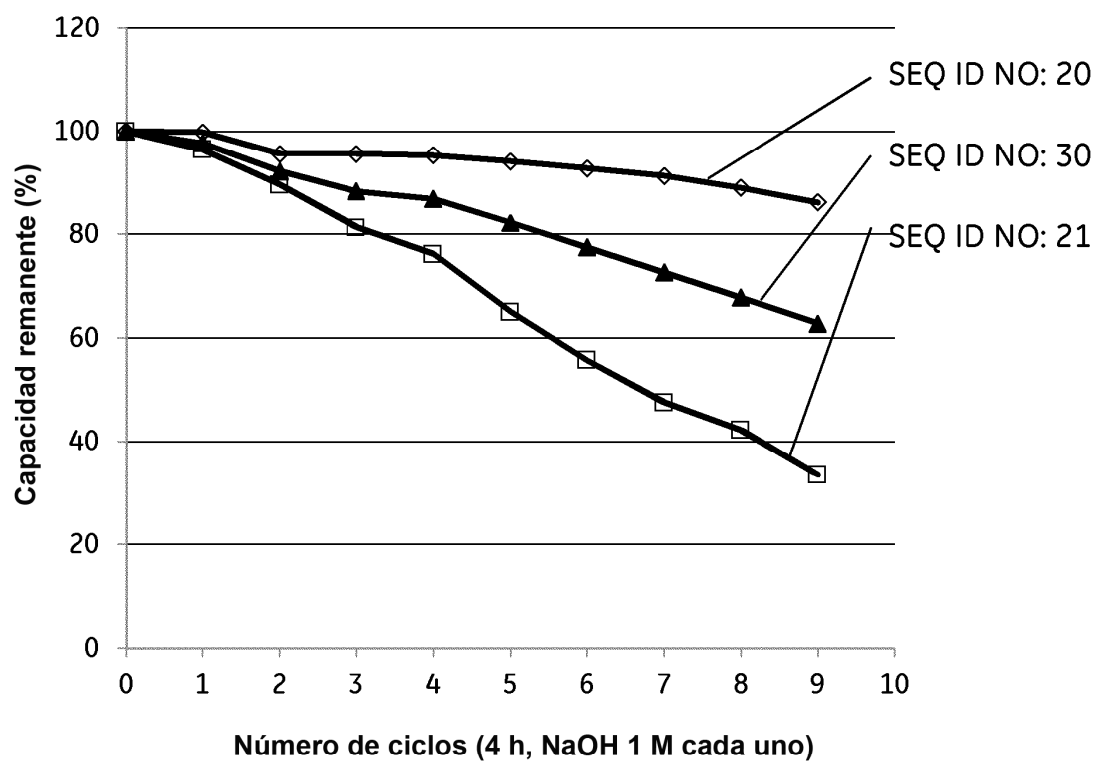


Fig. 4.

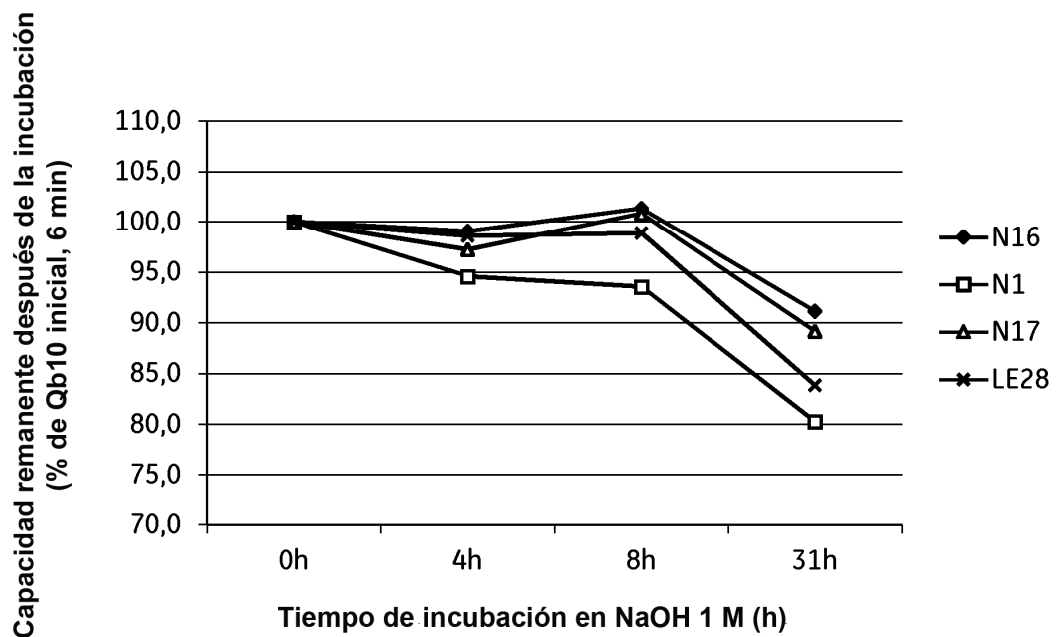


Fig. 5.

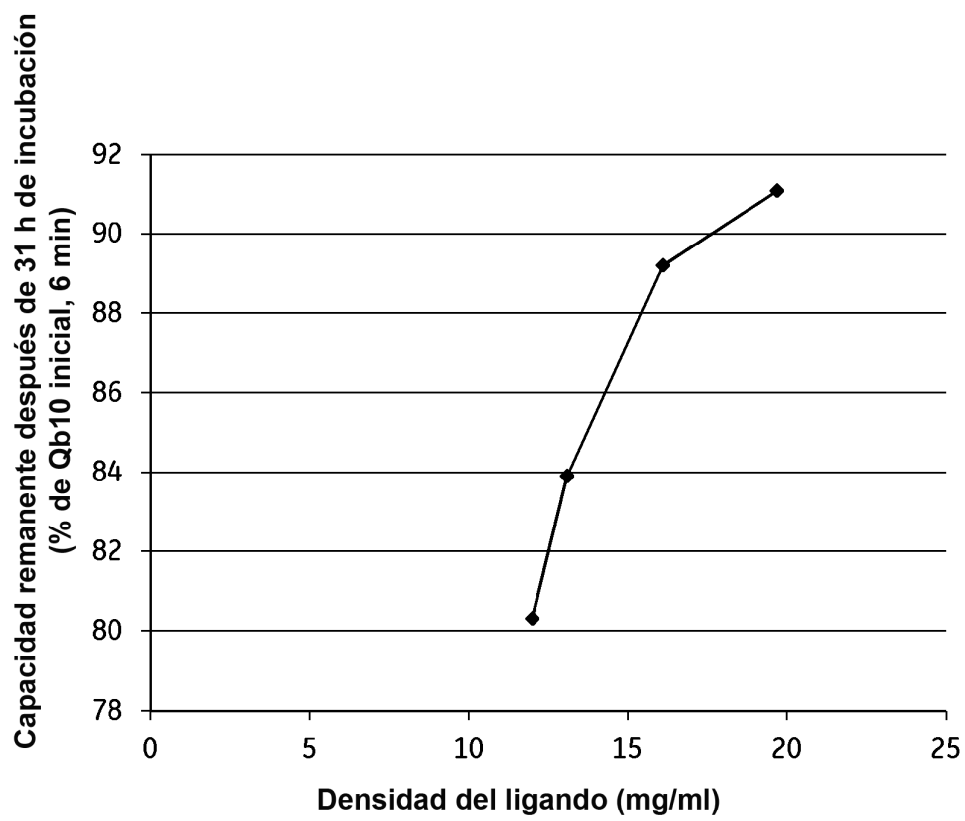


Fig. 6.

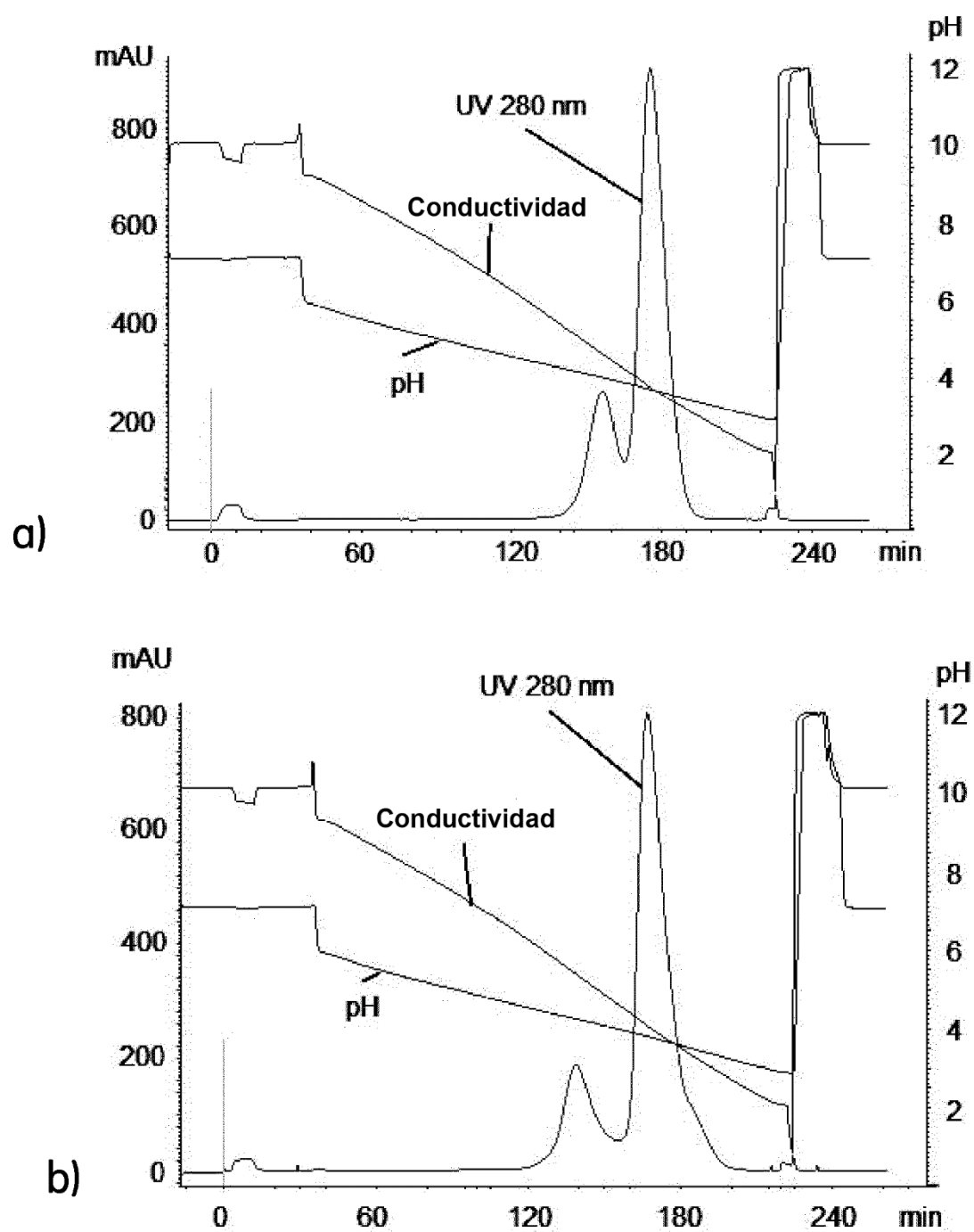


Fig. 7.

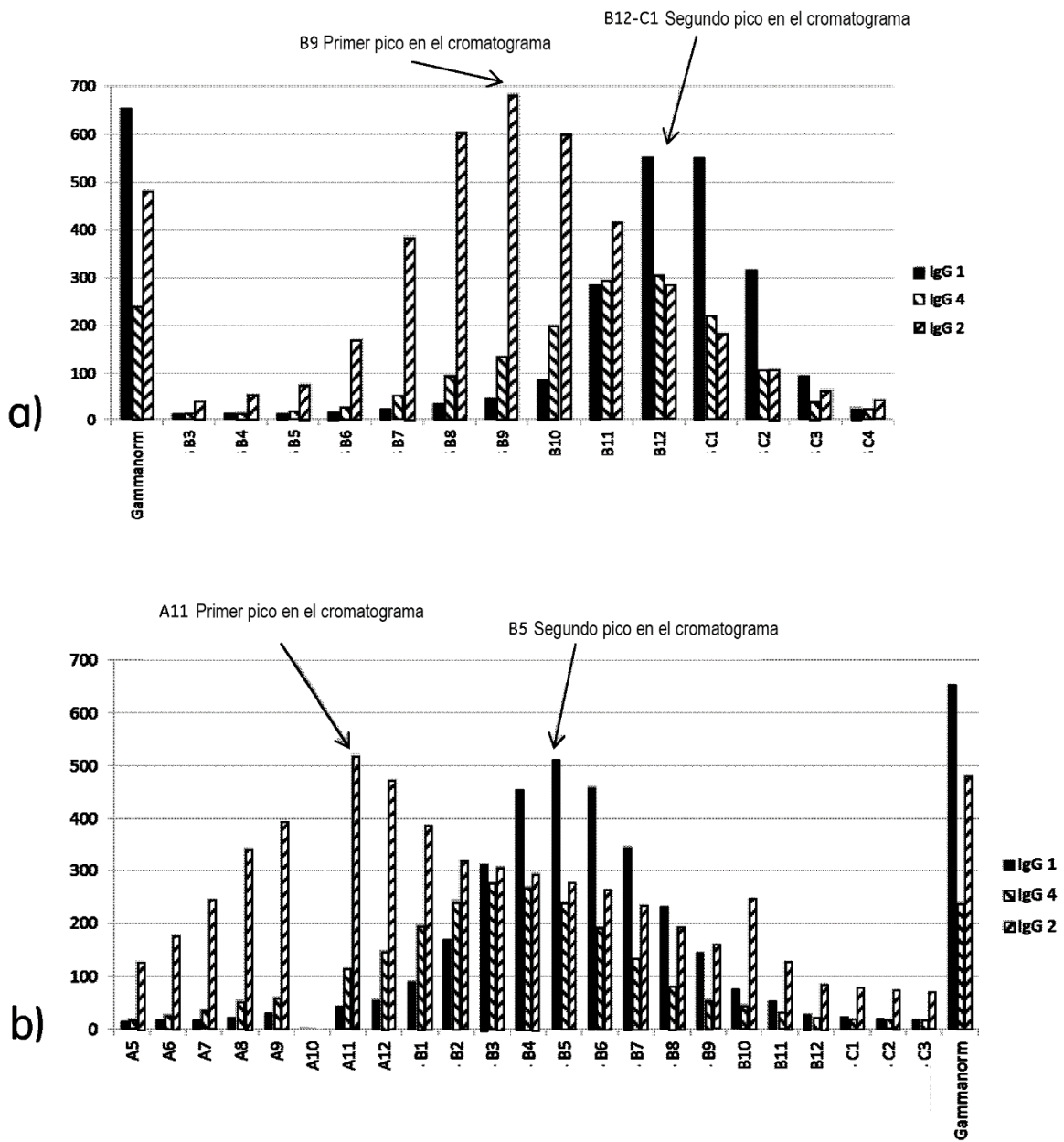


Fig. 8.

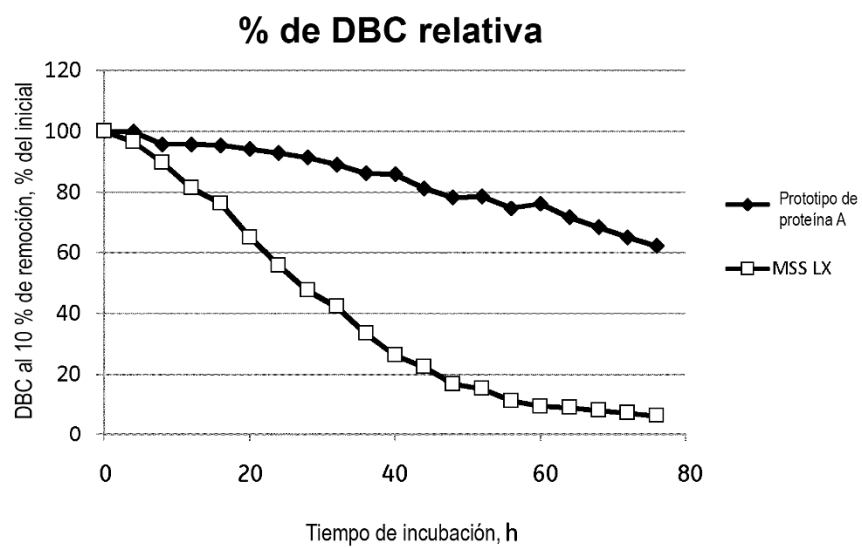


Fig. 9.

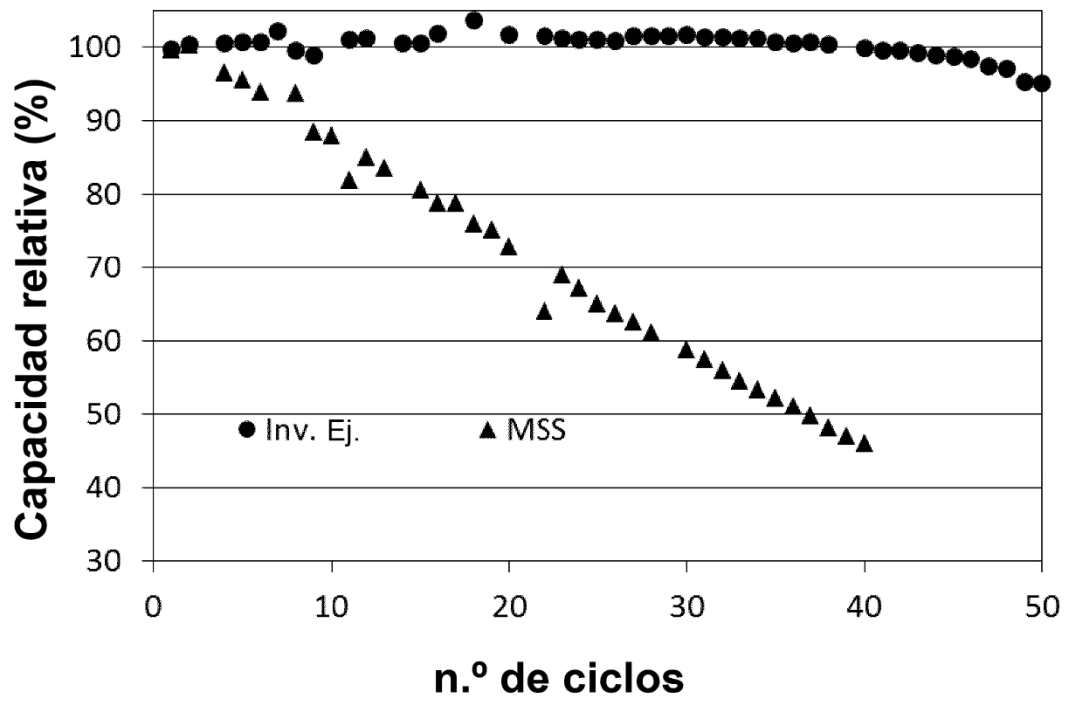


Fig. 10.

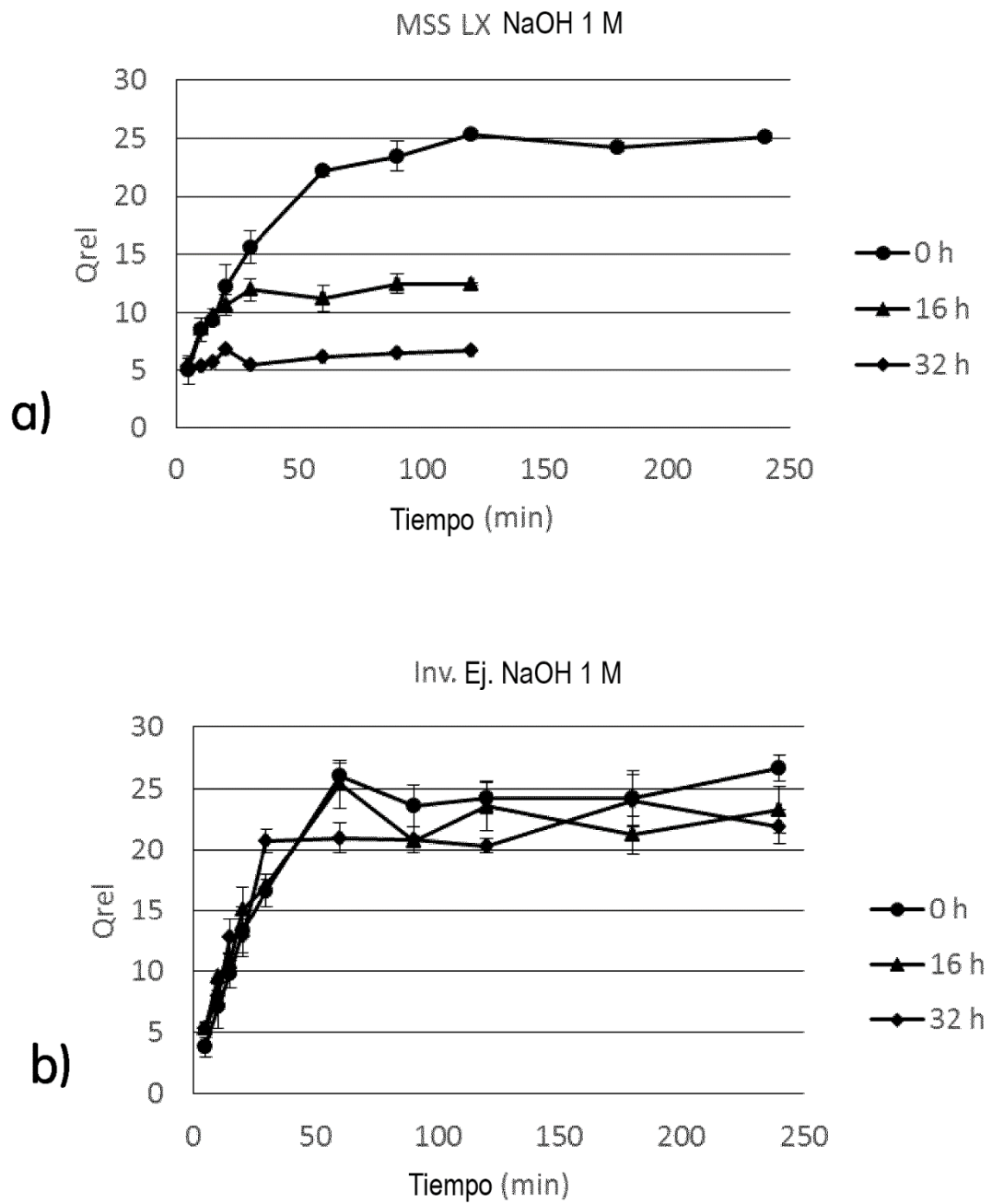


Fig. 11.

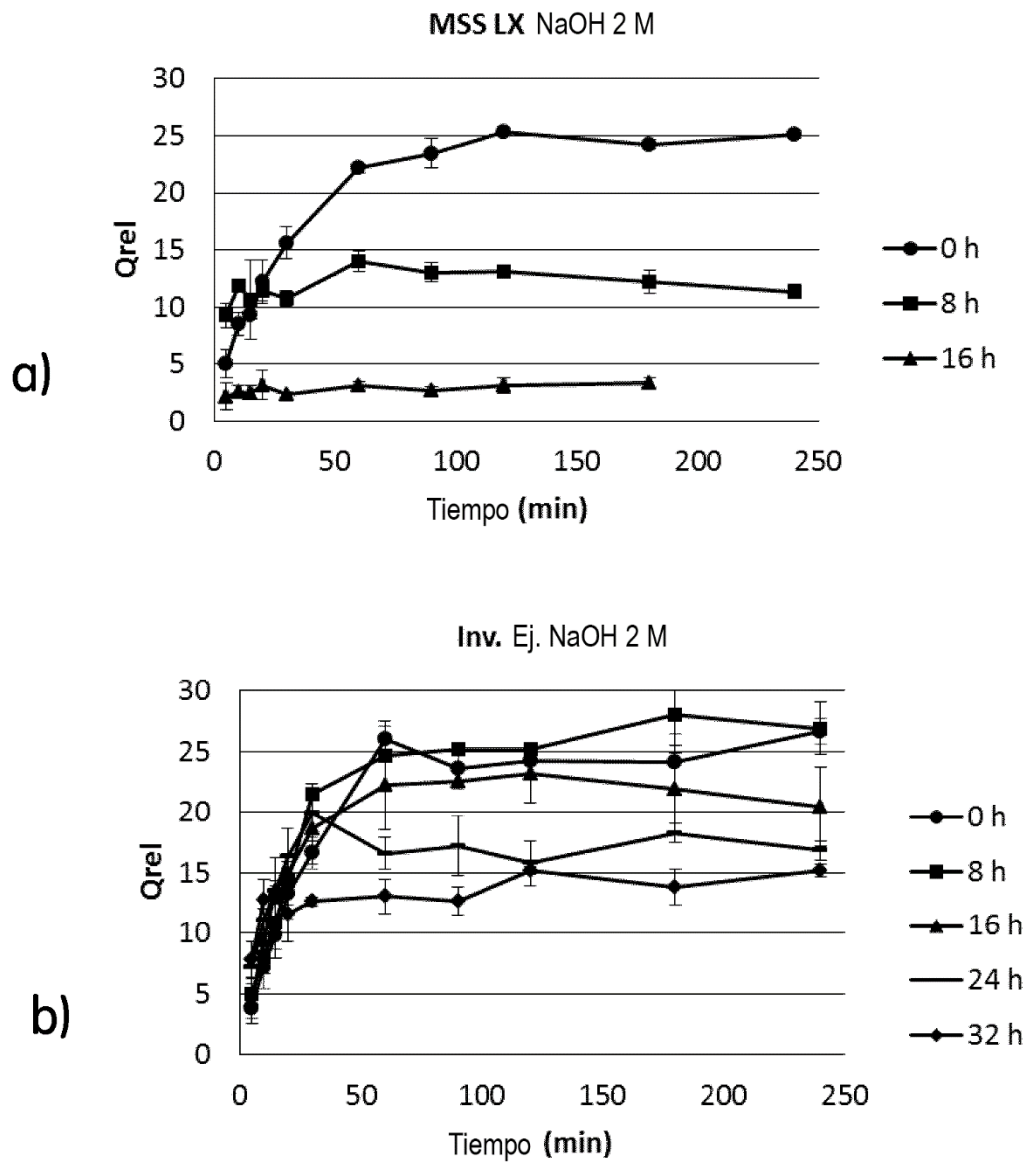


Fig. 12.

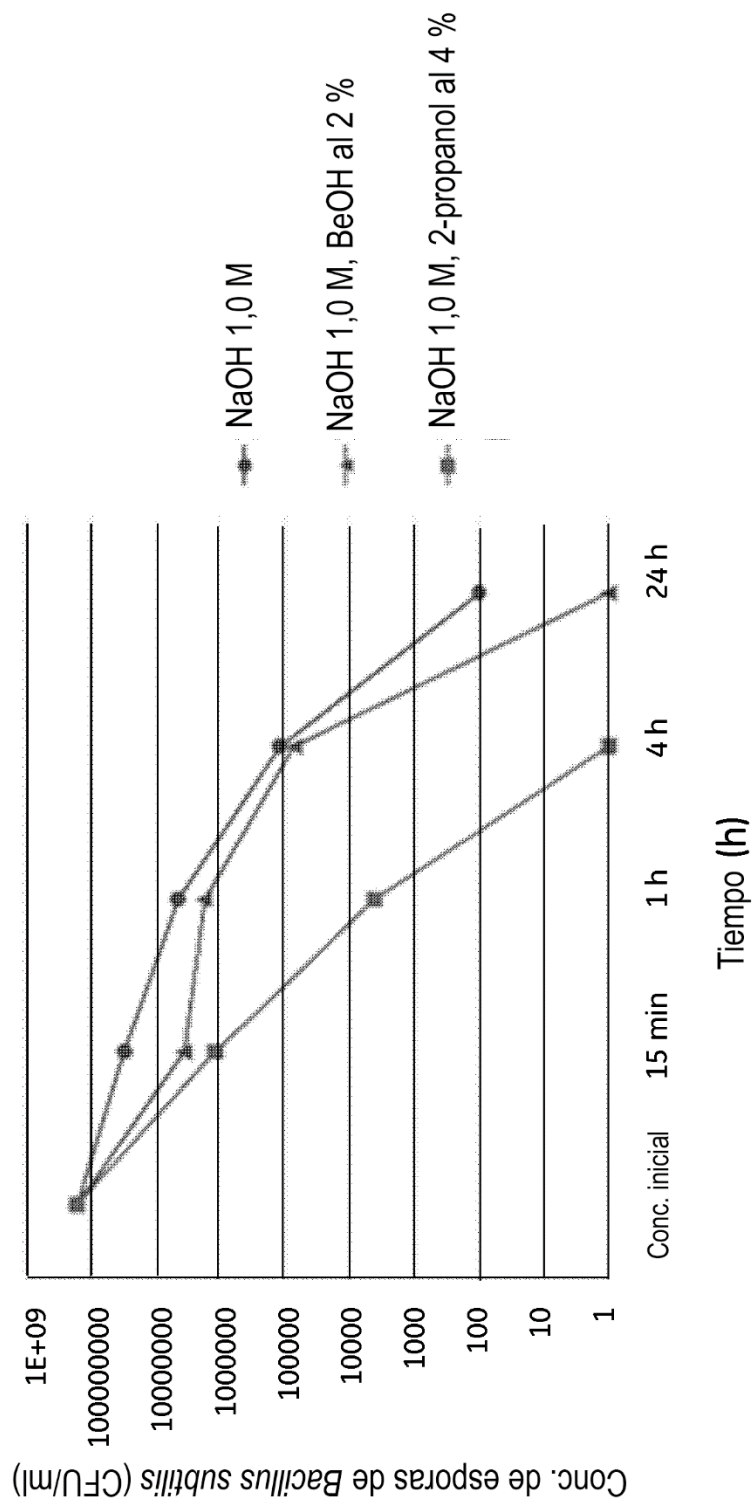


Fig. 13.